Der Einfluß von endogener Restsekretion an Insulin, von freiem Insulin und Insulinantikörpern auf die Stoffwechseleinstellung von Typ I Diabetikern

Edmund Edelmann

1981

Aus dem Institut für Diabetesforschung München
Vorstand: Prof. Dr. H. Mehnert
Prof. Dr. O.H. Wieland

Der Einfluß von endogener Restsekretion an Insulin, von freiem Insulin und Insulinantikörpern auf die Stoffwechseleinstellung von Typ I Diabetikern

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Edmund Edelmann
aus Augsburg
München 1980

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. W. Kemmler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Mehnert

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juni 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Herrn PD. Dr. W. Kemmler und Herrn Oberarzt Dr. K.-D. Gerbitz, die mir die Mitarbeit an der Studie, die dieser Dissertation zugrundeliegt, ermöglichten, danke ich gleichermaßen von Herzen dafür, daß sie mich in so vielfältiger Weise unterstützten.

Sie führten mich in die Methodik und Problematik dieser Arbeit ein und gaben mir wertvolle Anregungen bei der Auswertung und Niederschrift.

Insbesondere Herrn PD. Dr. W. Kemmler danke ich für seine zahlreichen Vorschläge und seine konstruktive Kritik, die mir halfen, den Inhalt der vorliegenden Arbeit um manche Idee zu bereichern, einige Irrtümer zu vermeiden und den sprachlichen Ausdruck zu verbessern.

Eine angenehme Pflicht ist es mir, Fräulein J. Summer für ihre ausgezeichnete Hilfe bei der Messung der Proben und der Auswertung der Daten zu danken.

Den Mitarbeitern des Instituts für Diabetesforschung danke ich für ihre Hilfsbereitschaft.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545801_0002

Inhaltsverzeichnis Seite

Zusammenfassung 1

Einleitung 4

Material
1. Geräte 11
2. Substanzen 12

Patienten
1. Auswahlkriterium der Patienten 13
2. Klinische Daten der Patienten 13
3. Modus und Technik der Blutabnahmen 14
4. Kriterien der Stoffwechseleinstellung 15

Methoden
1. C-Peptidbestimmung
- Puffer und C-Peptid Kit 22
- Herstellung der Lösungen 23
- Pipettierschema des Radioimmunoassays 24
- Pipettierschema der Polyaethylenglykol-vorbehandlung 25
- Überprüfung des PEG-vorbehandelten C-Peptidassays 25

2. Bestimmung des freien Insulins
- Pipettierschema der PEG-Vorbehandlung 26
- Überprüfung des PEG-vorbehandelten Radioimmunoassays für Insulin 26

3. Bestimmung des Gesamt-Insulins
- Pipettierschema der Abtrennung des Insulins vom Insulinantikörper 27

4. Charakterisierung der Insulinantikörper
- Herstellung der sauren Dextran-Kohle Citratpufferlösung 28
- Herstellung der Verdünnungsreihe des kalten Insulins 29

Seite

- Pipettierschema der Antikörpercharakterisierung 30
- Bestimmung der Bindungsparameter 30

5. Bestimmung der Serumglucose 32
6. Bestimmung des Alanins 32
7. Bestimmung des Laktats 32
8. Bestimmung der freien Fettsäuren 32
9. Statistische Methoden 32

Ergebnisse

Vorbemerkung 33
1. Ergebnisse aus der Bestimmung der Serumglucose 36
2. Ergebnisse aus der Bestimmung des C-Peptides 41
3. Ergebnisse aus der Bestimmung des freien und des antikörpergebundenen Insulins 55
4. Charakterisierung der insulinbindenden Antikörper 70
5. Ergebnisse aus der Bestimmung des Laktats, Alanins und der freien Fettsäuren 72

Diskussion

1. Zur Verwendung der Glucose als Parameter der Diabeteseinstellung 75
2. Diskussion der Ergebnisse aus der Bestimmung des C-Peptides
3. 2A. Diskussion der Methoden 80
   2B. Diskussion der Ergebnisse 85
3. Diskussion der Ergebnisse aus der Bestimmung des freien und des antikörpergebundenen Insulins, sowie der Charakterisierung der Insulinantikörper
   3A. Diskussion der Methoden 93
   3B. Diskussion der Ergebnisse 97
4. Diskussion der Ergebnisse aus der Bestimmung des Laktats, des Alanins und der freien Fettsäuren 108

Literaturverzeichnis 109

Lebenslauf

Zusammenfassung

Das Erreichen einer guten Stoffwechseleinstellung beim Diabetiker vom juvenilen Typ ist ein zentrales und bisher nicht ausreichend gelöstes Problem der Diabetestherapie.

Voraussetzung für die Entwicklung einer wirksamen Diabetestherapie ist, die Faktoren herauszufinden, die entweder eine gute metabolische Kontrolle beim insulinbehandelten Diabetiker verhindern - oder, im Gegenteil, diese bewirken.

Die vorliegende Studie wurde konzipiert, um einen Schritt in diese Richtung zu unternehmen. Bei 20 insulinbehandelten Diabetikern, deren Diabetesbeginn vor dem 40. Lebensjahr lag, erfolgte die Messung des C-Peptides, des freien und des antikörpergebundenen Insulins, der Serumglucose, des Laktats, der freien Fettsäuren und des Alanins über 24 Stunden. Diese Parameter wurden alle 2 Stunden bestimmt. C-Peptid, freies Insulin und antikörpergebundenes Insulin wurden nach Polyaethylenglykol-Vorbehandlung der Seren gemessen. Zusätzlich wurde eine Antikörpercharakterisierung durchgeführt. Die Stoffwechseleinstellung der Diabetiker wurde anhand der Glucoseeinstellung bewertet. Für die Beurteilung der Einstellung wurden die von Service und Molnar entwickelten Parameter MAGE und Labilityindex, der M-value von Schlichtkrull und die mittlere Blutglucosekonzentration verwendet.

Die Glucoseeinstellung der 20 Diabetiker war nicht zufriedenstellend. Nur zwei Diabetiker genügten dem Kriterium einer guten Stoffwechseleinstellung. Als Maß für eine gute metabolische Kontrolle wurde ein MAGE von unter 100 mg/dl betrachtet. Die Glucoseeinstellung der 20 Diabetiker war jedoch vergleichbar mit derjenigen, die von anderen Arbeitsgruppen bei ihren Kollektiven beobachtet wurde. Es darf daher angenommen werden, daß sie der Glucoseeinstellung entspricht, die im allgemeinen bei stationär mit Insulin behandelten Diabetikern angetroffen wird.

Acht der 20 Diabetiker hatten meßbares C-Peptid. Die Diabetiker mit einer residualen B-Zellfunktion waren signifikant besser ein-

gestellt als die Patienten ohne endogene Produktion. Änderungen in der C-Peptidsekretion der acht Diabetiker verliefen gleichsinnig mit den Konzentrationsschwankungen der Serumglucose. Ein Anhalt dafür, daß nach einem Ansteigen der Serumglucose die Sekretion des C-Peptides und damit des Insulins verzögert erfolgt, war aus dem 24^h-Profilen des C-Peptides und der Serumglucose nicht zu entnehmen. Möglicherweise handelt es sich daher beim fortschreitenden B-Zellversagen insulinpflichtiger Diabetiker nicht um ein qualitatives, sondern ausschließlich um ein quantitatives Phänomen.

Eine direkte Auswirkung der subkutanen Insulininjektion auf den Serumspiegel des freien Insulins scheint gegeben zu sein. Die Diabetiker mit einem höheren freien Insulin verfügten über eine bessere Glucoseeinstellung. Gleichzeitig waren dies die Diabetiker, die eine residuale B-Zellfunktion aufwiesen. Die B-Zellfunktion dieser Diabetiker reichte allerdings nicht aus, um ihr höheres freies Insulin zu erklären. Es wurde die Annahme favorisiert, daß sowohl die noch vorhandene residuale B-Zellfunktion als auch das höhere freie Insulin zur besseren Glucoseeinstellung dieser Patienten beigetragen haben. Die Mehrzahl der 20 Diabetiker zeigten keine Übereinstimmung zwischen dem Verlauf der 24^h-Profile des freien Insulins und der Serumglucose, bzw. des C-Peptides. Eine weitgehende Nachahmung der physiologischen Sekretion durch das freie Insulin ist nötig, um eine wirklich gute Diabeteseinstellung zu erzielen. Niedrige Konzentrationen des freien Insulins bei hohen Blutglucosewerten bergen die Gefahr von Hyperglykämien in sich, hohe Insulinkonzentrationen bei niedrigen Glucosewerten können Hypoglykämien verursachen. Beide Konstellationen waren bei der überwiegenden Zahl der 20 Diabetiker gegeben. Die Maxima des freien Insulins deckten sich in der Regel nicht mit den postprandialen "Glucosepeaks".

Die Ergebnisse aus der Bestimmung des freien und des gebundenen Insulins sprechen dafür, daß es frühzeitig nach Beginn der Insulintherapie - auch bei Gabe von hochgereinigten Rinder- oder Schweineinsulinpräparationen - zur Bildung von Antikörpern gegen Insulin kommt.

Eine klare Zuordnung der einzelnen Konzentrationsschwankungen des antikörpergebundenen Insulins zur Insulininjektion war bei acht Patienten nicht möglich. Bei den restlichen Diabetikern zeigte sich ein Maximum des gebundenen Insulins mit einer Latenz von meist 8 - 10 h nach der Insulingabe. Es bestanden außerordentlich starke Schwankungen des gebundenen Insulins. Wodurch sie bedingt sein könnten, wird diskutiert. Ein Einfluß des gebundenen Insulins auf die Diabeteskontrolle konnte nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich weder eine signifikante Korrelation der Parameter der Glucoseeinstellung mit dem gebundenen Insulin, noch sprach ein Vergleich der 24^{h}-Profile des gebundenen Insulins und der Serumglucose für eine Auswirkung des antikörpergebundenen Insulins auf die Glucoseeinstellung. Ebenso konnte keine unmittelbare Auswirkung der Charakteristiken der Insulinantikörper auf die metabolische Kontrolle festgestellt werden. Die Korrelationen der Affinitätscharakteristiken der insulinbindenden Antikörper (Bindungskapazität - Ab_1 u. Ab_2 - und Assoziationskonstante - K_1 u. K_2) mit den vier Parametern der Glucoseeinstellung waren nicht signifikant.

Einleitung

Seit der Entdeckung des Insulins durch Banting und Best und dem damit verbundenen Beginn der Insulintherapie verbesserte sich insbesondere die Prognose der Insulinmangeldiabetiker. Die Lebenserwartung und -qualität dieser Diabetikergruppe wird jedoch deutlich durch die Entstehung der diabetestypischen Veränderungen an den Kapillargefäßen eingeschränkt. So fand Nabarro in der Altersgruppe zwischen 35. und 40. Lebensjahr eine 13,9 fach erhöhte Mortalität bei Diabetikern im Vergleich zur übrigen Bevölkerung (1)

In zahlreichen Studien (Übersicht 2 / 3) wurde ein Zusammenhang zwischen "guter" Diabeteseinstellung und dem verzögerten Auftreten der diabetischen Mikroangiopathie aufgezeigt. Von verschiedener Seite wurde Kritik an diesen Arbeiten geäußert (4 / 5 / 6). Sie richtete sich gegen die im statistischen Sinne fragliche Beweiskraft von retrospektiven Studien, um die es sich hier handelte, gegen die angewandten Kriterien zur Kennzeichnung der Diabeteseinstellung und schließlich gegen die vorgenommene Unterscheidung zwischen "gut" und "schlecht" eingestellten Diabetikern, mit dem Hinweis, es würde nur "schlecht" und noch "schlechter" eingestellte Diabetiker geben. Während es schwerfällt, diese und andere Kritikpunkte im einzelnen zu entkräften, gibt es doch eine Reihe von Beobachtungen und Untersuchungen, die eine metabolische Hypothese der Entstehung der diabetischen Spätschäden unterstützen.

- So treten Veränderungen an der kapillären Basalmembran erst nach Beginn der diabetischen Stoffwechselstörung auf (7).

- Das Ausmaß der Mikroangiopathie der Retina und der Nierenglomeruli ist deutlich von der Dauer des manifesten Diabetes abhängig (8 / 9 / 10).

- Auch beim sekundären Diabetes (chronische Pankreatitis etc.) tritt nach Jahren eine Mikroangiopathie auf.

- In den Nieren von Nichtdiabetikern entwickeln sich, werden sie Diabetikern transplantiert, innerhalb weniger Monate diabetestypische Veränderungen (11).

Beeindruckend, wenngleich mit Vorbehalt auf die Verhältnisse beim Menschen zu übertragen, sind die Ergebnisse einiger tierexperimenteller Arbeiten.

- Neonatales Pankreasgewebe von isogenetischen Spendern wurde Streptozotocin-diabetischen Ratten transplantiert. Die Transplantation führte zu einer signifikanten Reduktion der mesangialen Verdickung (12 / 13).

- Bei Experimenten mit isogenetischen Langerhansschen Inseln, die diabetischen Versuchstieren über das Pfortadersystem in die Leber injiziert wurden, konnte eine ähnliche Regression der diabetischen vaskulären Komplikationen beobachtet werden (14 / 15).

- In einer prospektiven Studie an insulinbehandelten Streptozotocin-diabetischen Ratten wurde bei der "gut kontrollierten" Gruppe eine signifikant geringere Verdickung der glomerulären Basalmembran im Vergleich zu der Gruppe festgestellt, die auf hohe Plasmaglucosewerte eingestellt war (16).

All diese Studien deuten direkt oder indirekt auf die positive Auswirkung einer möglichst guten Diabeteseinstellung hin. Ebenso könnten eine Reihe der bisher diskutierten pathobiologischen Mechanismen, die die Entwicklung einer Mikroangiopathie fördern sollen, durch eine ungenügende Diabeteseinstellung zustandekommen (Übersicht bei 3).

Eine Folge der Insulintherapie mit artfremden Insulinen ist die Entstehung von Antikörpern, die gegen diese Insuline gerichtet sind (17). Als ein pathobiologischer Mechanismus zur Entstehung der Mikroangiopathie wird eine Ablagerung von Insulin-Insulinantikörperkomplexen mit nachfolgender Aktivierung von Komplement diskutiert (18). Spätkomplikationen im Sinne einer Mikroangiopathie treten jedoch auch bei Altersdiabetikern auf, die nie mit Insulin behandelt wurden. Immunologische Phänomene dürften deshalb bei der Pathogenese der diabetischen Komplikationen, wenn überhaupt, nur eine Bedeutung als Cofaktoren haben.

Fragliche genetische Dispositionen scheinen eher einen Schutz vor den mikroangiopathischen Veränderungen darzustellen (3). Vermutlich sind sie nicht kausal an der Entstehung der diabetestypischen Veränderungen beteiligt. Die oben dargelegten Studien zur metabolischen Pathogenese der diabetischen Spätschäden leiten zu dieser Annahme.

Eine Befürwortung der metabolischen Hypothese legt nahe, der Diabeteseinstellung, ihrer Optimierung und der Untersuchung von Faktoren, die sie beeinflußen könnten, besondere Aufmerksamkeit zu schenken. Ein Weg in diese Richtung ist die Untersuchung verschiedener Metabolite und Hormone, von denen bekannt oder zu vermuten ist, daß sie einen Einfluß auf die Stoffwechseleinstellung des Diabetikers ausüben. Mehr über derartige Metabolite und Hormone, ihre Tagesrhythmik bei insulinabhängigen Diabetikern und über ihre Auswirkung auf die Diabeteseinstellung zu erfahren, entspricht dem Anliegen dieser Studie. In diesem Rahmen erfolgte bei 20 insulinabhängigen Diabetikern die Messung des C-Peptides, des freien und des antikörpergebundenen Insulins, der Serumglucose, des Laktats, der freien Fettsäuren und des Alanins über eine 24 stündige Abnahmeperiode. Zusätzlich wurde eine Antikörpercharakterisierung nach der Methode von Gerbitz und Kemmler (19) durchgeführt.

Insbesondere die Bestimmung der beiden im Serum insulinpflichtiger Diabetiker vorkommenden Insulinfraktionen, des freien und des antikörpergebundenen Insulins, war bisher mit methodischen Schwierigkeiten behaftet (s.u.). Die vorliegende Arbeit, in der mit der Polyaethylenglykol-Fällung (= PEG-Fällung) antikörpergebundener Peptidhormone eine schnelle und einfache Methode zur Bestimmung des freien, des Gesamt-Insulins, des C-Peptides und der Antikörpercharakterisierung Anwendung fand (19), stellt die erste Untersuchung dieser Art an einem größeren Kollektiv dar.

Da mit einem Insulinassay nicht zwischen endogenem humanen und exogenem Rinder- oder Schweineinsulin unterschieden werden kann und exogenes wie endogenes Insulin teilweise an Antikörper ge-

bunden sind, scheidet die Insulinmessung als Methode zur Bestimmung einer eventuell vorhandenen B-Zellfunktion beim insulinbehandelten Diabetiker aus. Hier bietet sich die Messung von C-Peptid an. Humanes C-Peptid ist ein Molekül mit 31 Aminosäuren, das nach der Spaltung von Proinsulin, dem Vorläufer des Insulins, in der B-Zelle entsteht (20 / 21). In Abbildung 1 ist die Aminosäuresequenz des humanen Proinsulins dargestellt. Humanes C-Peptid wird weder an zirkulierende Insulinantikörper gebunden noch reagiert es mit möglicherweise vorhandenen Antikörpern gegen Rinder- oder Schweineproinsulin kreuz (22). Rinder- oder Schweineproinsulin können als Verunreinigung von kommerziellen Insulinpräparationen vorkommen. Das insbesondere nach einer Stimulation der B-Zellen im peripheren Blut gemessene C-Peptid vermag eine bessere Auskunft über die Sekretionsdynamik oder B-Zellen zu geben als Insulin (23 / 24 / 25). Somit kann die Bestimmung des C-Peptides eine wertvolle Methode sein, unser Wissen über die Funktion der B-Zellen des insulinbehandelten Diabetikers zu erweitern. Einer Reihe von Forschern gelang es, Assays zu entwickeln, die geeignet sind, die Konzentrationen des humanen C-Peptides im Serum zu messen (26 / 27 / 28). Seither wurde in einer großen Zahl von Arbeiten die klinische Bedeutung einer B-Zellrestfunktion beim insulinbehandelten Diabetiker untersucht. In der Mehrzahl dieser Studien wurde C-Peptid nach der Gabe von B-zellstimulierenden Substanzen bestimmt, insbesondere nach oraler Gabe von Glucose (29 / 30 / 31 / 32), i.v. applizierter Glucose (24 / 33), Arginin (24 / 29 / 33) und Glucagoninfusion (34 / 35), sowie einem standardisierten Frühstück (24 / 36). Bezüglich des C-Peptides war es das Anliegen dieser vorliegenden Arbeit, Aufschluß über die B-Zellfunktion insulinbehandelter Diabetiker unter Bedingungen zu erhalten, die denen des täglichen Lebens so gut wie möglich entsprachen. Es interessierten das Ausmaß der B-Zellfunktion, vor allem die Beziehung dieser Restfunktion zur Glucoseeinstellung, zur Insulindosis und zu den anderen in dieser Studie gemessenen Metaboliten. Anhand der erhaltenen Ergebnisse soll erörtert werden, inwieweit neben einer quantitativ verminderten

Insulinsekretion beim juvenilen Diabetes auch der Sekretionsverlauf verändert ist,und möglicherweise ein qualitativer Defekt der B-Zelle vorliegt. Abschließend soll die Frage diskutiert werden, wie eine positiver Einfluß dieser Restfunktion auf den Kohlenhydrathaushalt zu erklären ist, in Anbetracht hoher Spiegel zirkulierenden exogenen Insulins und ubiquitärer insulinbindender Antikörper.

Seit Berson und Yalow (17) die radioimmunologische Methode zur Bestimmung des Insulins einführten, wurde diese und abgeänderte Methoden weithin benutzt. Die Insulinspiegel bei insulinbehandelten Diabetikern konnten jedoch wegen der Anwesenheit zirkulierender Insulinantikörper nur sehr ungenau bestimmt werden. Die Insulinantikörper interferieren in der Reaktion zwischen dem markierten Insulin, dem freien Seruminsulin und dem jeweiligen Antiserum. In den letzten Jahren wurden mehrere Methoden zur Trennung von freiem und antikörpergebundenem Insulin bei insulinbehandelten Diabetikern beschrieben (Übersicht bei 19). Bei einigen dieser Methoden wird das Äquilibrium zwischen freiem und gebundenem Insulin während des Trennungsverfahrens beeinflußt. Die meisten Methoden sind zu zeit- und arbeitsaufwendig, um breitere Anwendung zu finden. Mit der PEG-Fällung, zuerst von Desbuquois und Auerbach (37) beschrieben, steht inzwischen ein einfaches, schnelles und zuverlässiges Verfahren zur Trennung des freien und antikörpergebundenen Insulins zur Verfügung. Es verwundert daher nicht, daß die ersten wenigen Arbeiten, die der Untersuchung des Schicksals des subkutan injizierten Insulins, der Serumspiegel des freien Insulins und ihren Zusammenhang mit der Diabeteseinstellung gewidmet waren, sich der PEG-Methode bedienten (38 / 39 / 40). Von der Anlage und der Zahl der untersuchten Patienten her (n = 5 - 9) sind diese Studien als Voruntersuchungen zu werten und in einem Fall (40), was die Auswahl des Patientenkollektives betrifft, nicht auf die endokrinologischen Verhältnisse der Mehrzahl der Diabetiker zu übertragen. Mit Hilfe der PEG-Methode erfolgte in der vorliegenden Studie die Bestimmung des freien und des Gesamt-Insulins. Besonderes Anliegen war es,

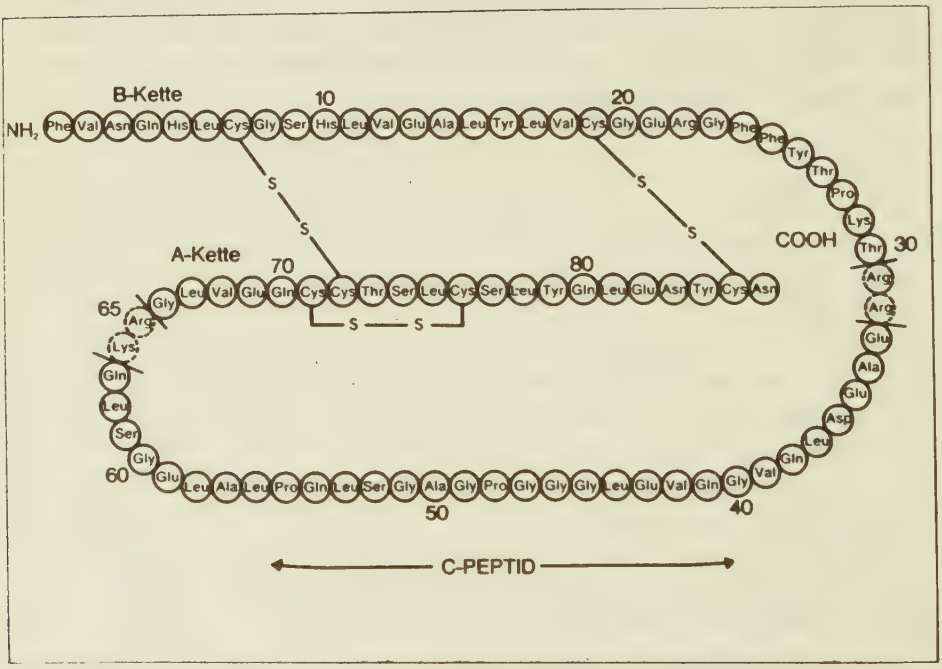
die klinische Bedeutung der Serumspiegel des freien und des antikörpergebundenen Insulins zu untersuchen. Damit ist der Einfluß der beiden Insulinfraktionen auf die Glucoseeinstellung, als Maß für die Diabeteskontrolle, und die Auswirkung des subkutan injizierten Insulins auf die Serumspiegel gemeint.

In der Literatur wird der Einfluß der Insulinantikörper auf die Diabeteseinstellung gegensätzlich beurteilt. Während einige Gruppen eine positive Auswirkung (41 / 42 / 43 / 44) auf die Stoffwechseleinstellung berichteten, machten andere gegenteilige Beobachtungen (45 / 46 / 47), und die Mehrzahl konnte keine deutlich feststellbaren Einflüsse konstatieren (48 / 49 / 50 / 51 / 52 / 53). Die Bestimmung der Bindungskapazität und der Assoziationskonstanten der Insulinantikörper der Patienten dieser Studie soll helfen, die Frage nach der klinischen Bedeutung der Insulinantikörper weiter abzuklären.

Abbildung 1

Aminosäuresequenz des menschlichen Proinsulins

Die bei der Spaltung von Proinsulin in Insulin und C-Peptid freigegebenen Aminosäurepaare der Positionen 31, 32 und 64, 65 sind bisher beim Menschen nicht identifiziert. Aus Analogie zu den aufgeklärten Aminosäuresequenzen der Proinsuline verschiedener Spezies ist die Paarung Arg-Arg und Lys-Arg wahrscheinlich.



Material

1. Geräte

Hettich Rotixa Standardzentrifuge
D-7200 Tübingen, Deutschland

Eppendorf Zentrifuge 3200
Eppendorf Thermostat 3401
Eppendorf Rotationsmischer 3300
Eppendorf Photometer 1101 M
Eppendorf Mikropipetten
Eppendorf Gerätebau Netheler & Hinz GmbH
D-2000 Hamburg, Deutschland

Waage Mettler P 160
Analysenwaage Typ H 15
Fa. Spoerhase AG, D-6300 Gießen, Deutschland

pH-Meter
Fa. L. Pusl, D-8000 München, Deutschland

Gamma-Zähler Modell 1195
SEARL Nuclear Chicago Division, Chicago USA

Teletypewriter Modell 33
Teletype Corporation, Illinois, USA

Hewlett Packard 21 MX Computer
Hewlett Packard 2748 B Tape Reader
Hewlett Packard 7210 A Digital Plotter
Hewlett Packard 7900 A Disc Drive
Hewlett Packard 13215 A Disc Power Supply
D-6000 Frankfurt / Main, Deutschland
über Silent 7000 Electronic Data Terminal
Texas Instruments, D-8050 Freising, Deutschland

Laktat Analyser 640
Hoffmann-La Roche,
über Kontron-Medizinzentrale
D-8057 Eching, Deutschland

Jenaer Glaswaren
Fa. Schott, D-6500 Mainz, Deutschland

2. Substanzen

Radioimmunbesteck zur Bestimmung von Human-Insulin
RIA-Gnost Insulin PEG
Behringwerke AG, D-6000 Frankfurt / Main, Deutschland

Radioimmunoassay Kit für humanes C-Peptid
Novo Research Institute, Bagsveard, Dänemark

Organische und anorganische Chemikalien
Fa. Boehringer Mannheim GmbH
D-6800 Mannheim, Deutschland

Fa. Behring
D-6000 Frankfurt / Main, Deutschland

Fa. Merck
D-6100 Darmstadt, Deutschland

Patienten

1. Auswahlkriterium der Patienten

20 insulinbehandelte Diabetiker, die sich zur Stoffwechselkontrolle im Städt. Krankenhaus München-Schwabing, III. Med. Klinik befanden, wurden für diese Studie untersucht.
Auswahlkriterium der Patienten für diese Studie war ihre Einwilligung, an der 24 stündigen Abnahmeperiode teilzunehmen. Es wurde keine Auswahl in Hinblick auf "gut eingestellte" Diabetiker getroffen.
Es wurden ausschließlich Diabetiker in diese Studie aufgenommen, deren Erstmanifestation des Diabetes vor dem 40. Lebensjahr war.

2. Klinische Daten der Patienten

Die Klinischen Daten der Gruppe der 20 Diabetiker können aus Tabelle 1 ersehen werden.
Die Diabetesdauer der dreizehn Frauen und sieben Männer lag zwischen einem Monat und 33 Jahren ($\bar{x}$ = 9,9 ; sd = 10,5 Jahre).
Die Dauer der Insulinbehandlung war in einem Bereich zwischen fünf Tagen und 33 Jahren ($\bar{x}$ = 9,3 ; sd = 10,8 Jahre). Das Alter bei Diabetesbeginn reichte vom 3. bis zum 37. Lebensjahr ($\bar{x}$ = 20,4 ; sd = 8,7 Jahre).
Mit Ausnahme der Patienten A.J. und O.F. war das Gewicht der Diabetiker innerhalb von $\pm$ 10 % des Idealgewichtes.
Die Patienten erhielten unterschiedliche Insulinarten verabreicht. Die Mehrzahl, elf Diabetiker wurden mit Depot Hoechst CR behandelt. Ein Teil der Patienten bekam das in Tabelle 1 angegebene Insulin erst seit kurzem (weniger als einen Monat). Am Abnahmetag wurden den 20 Patienten zwischen 20 und 82 Einheiten Insulin verabreicht ($\bar{x}$ = 42 E ; sd = 17,8 E), oder in E / kg / 24^h ausgedrückt zwischen 0,29 und 1,28 E / kg / 24^h ($\bar{x}$ = 0,69 ; sd = 0,26 E / kg / 24^h).
Mit Ausnahme des Diabetikers P.P., der drei Insulingaben täglich um 6.45, 12.30 und 19.00 Uhr erhielt und den Patienten H.E. und J.W., die mit einer Insulinspritze pro Tag eingestellt wurden, bekamen alle Patienten morgens zwischen 6.30 und 7.15 Uhr und nach-

mittags zwischen 16.30 und 17.00 Uhr Insulin gespritzt.
Das Essen wurde entsprechend der jeweiligen Diät (s. Tab. 1) auf sieben Mahlzeiten pro Tag verteilt. Die Essenszeiten waren mit Unterschieden von ± 15 min:
7.15 - 9.15 - 11.45 - 13.45 - 15.45 - 17.15 - 19.30 Uhr.
Die von den Patienten hierbei eingenommenen Kalorien reichten je nach Ernährungszustand, Körpergröße und Geschlecht von 1000 bis 2800 kcal/d.

In Tabelle 2 sind die Einweisungsgründe der Patienten aufgeführt, sowie diabetische Spätschäden und außerdem Erkrankungen der Patienten, die keine unmittelbare Beziehung zur Grundkrankheit Diabetes mellitus haben.

Elf der 20 Patienten wurden wegen zu hoher Blutzuckerwerte von ihrem Hausarzt zur Einstellung überwiesen. Hierunter waren drei Patienten, die vorher allein mit Diät und oralen Antidiabetica therapiert wurden und die erst während ihres stationären Aufenthaltes auf Insulin umgestellt wurden. J.E. wurde wegen eines ketoazidotischen Komas und R.H. wegen eines hypoglykämischen Schocks stationär behandelt. Beide Patienten waren zu Beginn des Krankenhausaufenthaltes in der Intensivstation. Bei V.G. handelte es sich um einen frisch entdeckten Diabetiker, der in der Klinik auf Insulin eingestellt wurde. Bei drei Patienten waren gehäuft auftretende hypoglykämische Zustände, die ohne Bewußtseinsverlust einhergingen, der Einweisungsgrund. C.B. befand sich zur Abklärung einer Insulinallergie, und R.B. wegen einer Lipodystrophie in stationärer Behandlung.

3. Modus und Technik der Blutabnahmen

Bei allen in dieser Studie dargestellten Patienten erfolgten mindestens 11, höchstens 13 Blutabnahmen über eine 24^{h}-Periode. Die Abnahmen wurden alle zwei Stunden durchgeführt. Sie wurden über eine Teflonkanüle vorgenommen, die in eine Antecubitalvene eingebracht und mit einer 0,9 % igen NaCl-Lösung während der Abnahmezeit offen gehalten wurde. Keiner der 20 Patienten war während der Abnahmeperiode bettlägerig. Eine gewisse Behinderung der Patienten

war durch die stets mitzuführende Kochsalzinfusion gegeben. Die Lebensbedingungen entsprachen sonst durchaus dem Tagesablauf, bei dem üblicherweise in der III. Med. Klinik eine stationäre Einstellung durchgeführt wird.

Pro Abnahme wurden jedem Patienten 10 ml Blut entnommen. Die Zentrifugation der Blutproben erfolgte so schnell wie möglich (ca. eine viertel bis eine halbe Stunde nach der Blutabnahme). Nach der Zentrifugation wurde das Serum in 1,5 ml Eppendorf cups aufgeteilt und bei -25°C bis zur Messung aufbewahrt. Die längste Aufbewahrungszeit für ein Patientenserum war ein Jahr.

4. Kriterien der Stoffwechseleinstellung

Die Stoffwechseleinstellung der Diabetiker wurde anhand der Glucoseeinstellung bewertet. Für die Kennzeichnung der Glucoseeinstellung wurden die von Service und Molnar entwickelten Parameter MAGE (54) und Labilityindex (55), der M-value von Schlichtkrull (56) und die mittlere Blutglucosekonzentration (MBG) verwendet.

Der MAGE von Service et al. (54)

Der MAGE (mean amplitude of glycemic excursions) wurde von Service et al. als ein Maß für Glucoseschwankungen, bzw. die "diabetische Instabilität" entwickelt. Das Interesse der Autoren galt der Amplitude der Glucoseschwankungen und nicht der Verteilung der Glucosewerte, für die die Standardabweichung das Maß ist. Service et al. verwendeten für die Errechnung des MAGE Glucoseschwankungen, die höher als eine halbe, eine oder das 1,5 fache einer Standardabweichung vom Mittelwert waren. Für diese Studie wurden Glucoseschwankungen, die größer als eine Standardabweichung waren, zur Errechnung des MAGE herangezogen.
Detailliert sei die Berechnung des MAGE am Beispiel der Glucosekurve der Diabetikerin A.J. erläutert. Die Glucosekurve dieser Patientin ist in Abbildung 2 dargestellt.

Die erste Glucoseschwankung von 282 bis 84 mg/dl reichend beträgt 198 mg/dl. Der erste Glucoseanstieg erstreckt sich von 84 bis 426 mg/dl, umfaßt also 342 mg/dl. Der zweite Glucoseabfall reicht von 426 bis 264 mg/dl und beträgt 162 mg/dl. Alle drei genannten und aus Abb. 2 zu ersehenden Glucoseschwankungen sind größer als die Standardabweichungen vom Mittelwert (sd = 81 mg/dl) und könnten demnach in die Berechnung des MAGE eingehen. Es werden jedoch nur die Schwankungen berücksichtigt, die dem Verlauf der ersten Glucoseschwankung, die größer ist als eine Standardabweichung, entsprechen. Im Falle der Glucosekurve der Patientin A.J. sind dies alle Schwankungen, die vom Glucosemaximum zum Glucosenadir gerichtet sind. Sie betragen 198, 162, und 205 mg/dl (s. Abb. 2). Daraus ergibt sich für die Berechnung des MAGE: $\frac{198 + 162 + 205}{3} = 188$ mg/dl.

Der M-value von Schlichtkrull (56)

In den M-value gehen hohe wie niedrige Glucosewerte negativ ein. Er beruht teilweise auf einer mathematischen Formel mit der die Glucose, von einem Normal- oder Nullwert von 120 mg/dl ausgehend, nach oben wie unten in ansteigender Reihe negativ bewertet wird. Die Formel lautet:

$$M_{BG}^{BG} = \left(10 \times \log \frac{BG}{120} \right)^3$$

Glucoseschwankungen werden derart berücksichtigt, daß von den einzelnen Glucosewerten der niedrigste vom höchsten Wert abgezogen, und die Differenz durch die Anzahl der Glucoseschwankungen innerhalb der Abnahmeperiode dividiert wird ($= M^S$).

$$\text{M-value} = M_{BG}^{BG} + M^S ;$$

Die mittlere Bluglucosekonzentration (MBG)

Sie ergibt sich aus dem arithmetischen Mittel der einzelnen Glucosewerte.

Der Labilityindex von Molnar (55)

Der Labilityindex gibt, so wie er hier errechnet wurde, ein Maß der Glucoseeinstellung über einen längeren Zeitraum. Der Index wurde aus dem Mittelwert der quantitativ bestimmten Uringlucose (g/24^h) mehrerer Tage, plus der dreifachen Standardabweichung von diesem Mittelwert berechnet. Berechnungsgrundlage war der Zeitabschnitt vom 5. Tag vor Beginn der Abnahmeperiode, bis zum letzten Tag des Krankenhausaufenthaltes der Patienten.

Tabelle 1

Klinische Daten der 20 Diabetiker vom juvenilen Typ

Initialen	Alter, Geschlecht	Alter bei Diabetesbeginn	Diabetesdauer (Jahre)	Dauer der Insulinbehandl. (Jahre)
O.F.	24, F	21	3	3
R.H.	44, F	20	24	24
C.B.	27, F	21	6	6
B.L.	36, F	8	28	28
P.P.	45, M	28	17	17
A.J.	18, F	11	7	7
E.B.	22, F	11	11	11
E.M.	49, M	16	33	33
L.S.	25, F	17	8	8
W.D.	30, M	3	27	27
M.G.	34, F	29	5	3
M.S.	17, F	16	1	1
R.B.	21, F	20	1	0,5
I.F.	20, F	16	4	4
J.W.	28, F	27	1	8 Tage
E.R.	48, F	32	16	13
V.G.	32, M	32	1 Monat	5 Tage
H.E.	40, M	37	3	22 Tage
J.E.	26, M	24	2	2
B.G.	20, M	18,5	1,5	6 Tage

ewicht in % es Idealge- ichtes	Diät kcal/Tag	Insulin- art	Insulindosis in Einheiten morgens	abends	Einheiten/kg 24h
15,3	1600	D-H CR	50	16	1,00
1,4	1900	D-H CR	14	8	0,43
3,3	2200	D-H CS	24	16	0,71
2,1	1600	D-H CR	16	4	0,48
2,9	2300	Mix	12 3	10	0,42
28,8	1000	Mix	40	20	0,88
8,5	1200	D-H CR	40	12	0,95
7,1	2000	D-H CR	20	4	0,44
6,7	1600	D-H CR	44	20	1,06
	2100	D-H CR	24	12	0,6
6,8	1200	D-H CS	24	6	0,55
1,9	1800	D-H CR	54	28	1,28
7,7	1600	Mix	32	8	0,79
8,1	1400	D-H CS	28	10	0,64
6,4	2000	D-H 03R	28	-	0,52
7,7	2800	K-H/D-H CS	38	10	0,9
0,3	2400	D-H 03S	36	10	0,59
2,4	1200	D-H CR	30	-	0,44
8,8	2200	D-H CR	36	24	0,77
6,5	2400	D-H CR	16	4	0,29

D-H = Depot Hoechst
K-H = Komb Hoechst
Mix = Mixtard Leo

Tabelle 2

Einweisungsgründe und sonstige Erkrankungen der 20 Diabetiker

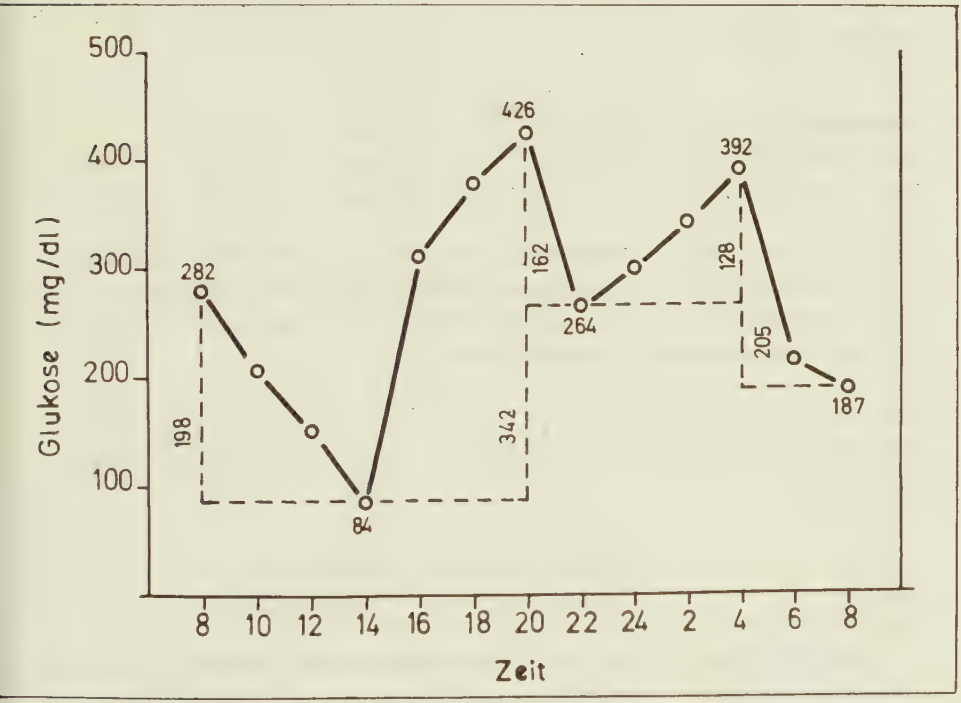
Initialen	Einweisungsgrund	Spätschäden	Erkrankungen
O.F.	hohe Blutglucose	-	Hypertonus
R.H.	hypoglyk. Zustände	R III, Nierenins.,	Hypertonus
C.B.	Insulinallergie	-	-
B.L.	h. BG	R III, Niereninsuffizienz	
P.P.	h. BG	Diffuse Nierenparenchymschäden	
A.J.	h. BG	-	Psoriasis
E.B.	h. BG	-	-
E.M.	hypoglyk. Zustände	Polyneuropathie	-
L.S.	h. BG	R O - I	-
W.D.	hypoglyk. Zustände	R I	Hypertonus
M.G.	hypoglyk. Zustände	-	Hypertonus
M.S.	h. BG	-	-
R.B.	Lipodystrophie	-	-
I.F.	h. BG	-	-
J.W.	h. BG / Ersteinstellung	-	-
E.R.	h. BG	R O - I	Ulcera am li. Fußrücken
V.G.	h. BG / Erstmanifestat.	-	-
H.E.	h. BG / Ersteinstellung	Polyneuropathie	-
J.E.	ketoazidotisches Koma	-	-
B.G.	h. BG / Ersteinstellung	-	labiler Hyper tonus

h. BG = hohe Blutglucose
R I - R III = Retinopathia diabetica I - III

Abbildung 2

Beispiel für die Berechnung des MAGE anhand der Serumglucosekurve der Diabetikerin A.J.

Erläuterung zu der Abbildung s. Text. S. 15 / 16



Methoden

1. C-Peptidbestimmung

C-Peptid wurde mit einem Radioimmunoassay Kit des Novo Forschungsinstitutes Bagsveard, Dänemark, nach Fällung des antikörpergebundenen Proinsulins mit Polyäthylenglykol bestimmt.

Puffer und C-Peptid Kit

FAM ist ein 0,04 M Phosphatpuffer, pH 7.4. Die Zusammensetzung ist wie folgt:

Na_2HPO_4, $2H_2O$	5,77g
NaH_2PO_4, H_2O	1,05g
Humanalbumin (Behringwerke)	1,00g
Natriumazid	0,24g
Destilliertes Wasser um	1000ml zu erhalten

NaFAM ist ein 0,04 M Phosphatpuffer, pH 7.4, der NaCl enthält, um eine Isotonie mit humanem Serum zu erreichen und 6 % Albumin, um die Proteinkonzentration humanen Serums nachzuahmen.
Die Zusammensetzung ist wie folgt:

NaCl	0,6g
Humanalbumin (Behringwerke, trocken, reinst)	5,9g
FAM um	100ml zu erhalten

PEG in FAM

Polyäthylenglykol (Carbowax 6000)	25 g
FAM um	100ml zu erhalten

Der C-Peptid Kit ist für den Radioimmunoassay humanen C-Peptides im Serum bestimmt. Er enthält Ampullen mit den folgenden drei gefrier-getrockneten Substanzen:

A. 1 nmol synthetisches humanes C-Peptid (57) das in 1 ml NaFAM lyophilisiert ist.
B. ^{125}J-markiertes synthetisches humanes Tyr-C-Peptid (58), ca. 100 pmol sind in 1000 ul Aqua dest. das 1 % humanes Albumin enthält aufgelöst.

C. 1 ml (1:200) Antiserum M 1230, das gegen synthetisches humanes C-Peptid gerichtet ist und von immunisierten Guinea Schweinen gewonnen wurde (59).

Herstellung der Lösungen

A. Synthetisches humanes C-Peptid

Dem Gefäß (A), das 1 nmol synthetisches humanes C-Peptid enthielt, wurden 900 ul destilliertes Wasser zugegeben. Dies ergab eine Lösung an C-Peptid von 1 nmol/ml NaFAM.
Die Erstellung der einzelnen Standardlösungen wurde folgendermaßen vorgenommen:

10	pmol/ml:	100 ul von 1 nmol/ml + 9.9 ml NaFAM
1	pmol/ml:	3 ml von 10nmol/ml + 27 ml NaFAM
0.7	pmol/ml:	7 ml von 1 pmol/ml + 3 ml NaFAM
0.5	pmol/ml:	5 ml von 1 pmol/ml + 5 ml NaFAM
0.3	pmol/ml:	3 ml von 1 pmol/ml + 7 ml NaFAM
0.2	pmol/ml:	2 ml von 1 pmol/ml + 8 ml NaFAM
0.1	pmol/ml:	1 ml von 1 pmol/ml + 9 ml NaFAM
0.05	pmol/ml:	0.5 ml von 1 pmol/ml + 9.5 ml NaFAM

Vor dem Einfrieren bei -25°C wurden die verschiedenen Standardlösungen in jeweils 5 - 10 mit Deckel versehenen Plastikgefäße pipettiert, um ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Lösungen zu vermeiden.

B. ^{125}J-markiertes synth. hum. Tyr-C-Peptid

Unmittelbar nach Erhalt des Kit wurde der Inhalt des Gefäßes B in 900 ul Aqua dest. gelöst und bei -25°C eingefroren. Vor Beginn des Radioimmunoassays wurde das aufgetaute ^{125}J-Tyr-C-Peptid 1 : 300 in FAM verdünnt (z.B. 50 ul 100 pmol/ml ^{125}J-Tyr-C-Peptid + 14.95 ml FAM).

C. Antiserum M 1230

Zugabe von 900 ul Aqua dest. zum Gefäß C und Einfrieren bei -25°C bis zur Wiederverwendung. Vor Beginn des Immunoassays wurden 50 ul

des Antiserums in 7.45 ml FAM pipettiert um eine 1 : 30 000 Verdünnung zu erhalten.

Pipettierschema des Radioimmunoassays

1. 200 ul 25 % iges PEG in FAM + 200 ul synthetisches humanes C-Peptid (0 - 10 pmol/ml), bzw. 200 ul Humanserum wurden in Eppendorf cups pipettiert, für 2 min bei Raumtemperatur geschüttelt, anschließend bei 10 000 x g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in Assay-Plastikgefäße á 100 ul verteilt. Bei den 1 : 1 verdünnten Standardlösungen wurde eine Dreifach-, bei den im selben Verhältnis verdünnten Humanseren eine Zweifachbestimmung durchgeführt.

2. Den Standardlösungen, wie den Humanseren wurden dann 100 ul Antiserum M 1230 (1 : 30 000) je Probe hinzugefügt, für 1 min bei Raumtemperatur geschüttelt und für 20 bis 24 h bei $4^{o}C$ inkubiert.

3. Nach dieser Inkubationszeit wurden 100 ul ^{125}J-Tyr-C-Peptid den Seren und Standardlösungen hinzugefügt, wobei die Temperatur der Lösungen bei $4^{o}C$ gehalten wurde. Das Gemisch wurde bei $4^{o}C$ für 1 min geschüttelt und anschließend bei der nämlichen Temperatur für 20 bis 24 h inkubiert.

4. Im Anschluß daran wurden 1,4 ml 95 % iges Äthanol allen Assayproben zugegeben, das Gemisch geschüttelt (ca. 10 s) und bei $4^{o}C$ und 2000 x g zentrifugiert. Die Assayproben wurden bei diesem Vorgang bei $4^{o}C$ gehalten, das Äthanol hatte Zimmertemperatur als es den Proben hinzupipettiert wurde.

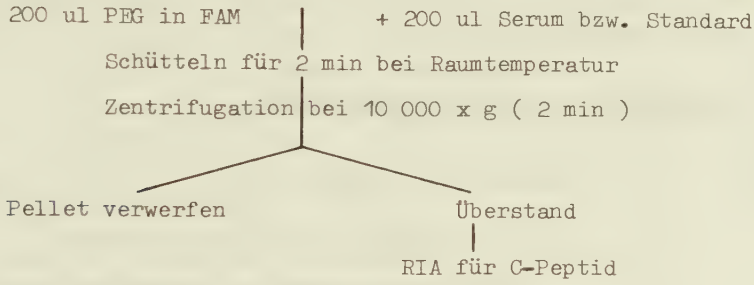
5. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, und das Präzipitat mit 1,7 ml einer Lösung, die aus 960 ml 95 % igem Äthanol, 18 ml FAM und 162 ml H_2O erstellt wurde, gewaschen.

6. Nach einer weiteren Zentrifugation bei $4^{o}C$ und 2000 x g (10 min) wurde der Überstand verworfen und dem nunmehr

von der Radioaktivität des Überstandes gereinigten Präzipitat, 0,05 ml einer 0,05 N NaOH-Lösung zugegeben.

7. Die Messung der Radioaktivität des Präzipitates erfolgte im Gammazähler. Die Zählraten wurden auf Lochstreifen festgehalten.

Pipettierschema der PEG-Vorbehandlung


200 ul PEG in FAM
+ 200 ul Serum bzw. Standard
Schütteln für 2 min bei Raumtemperatur
Zentrifugation bei 10 000 x g (2 min)
Pellet verwerfen
Überstand
RIA für C-Peptid

Überprüfung des PEG-vorbehandelten C-Peptidassays

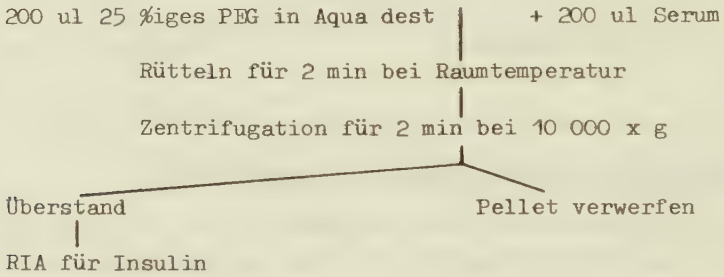
Das Antiserum M 1230 zeigte eine relativ niedrige Kreuzreaktivität mit humanem Proinsulin - 11 % auf molarer Basis (60). Die Sensitivität der Standardkurve, als Prozent-Abnahme gebundenen Tracers nach Zugabe von 0,1 pmol/ml C-Peptid definiert, liegt bei 15,5 % (60).
Die Sensitivität des PEG-C-Peptidassays, d.h. die geringste Konzentration an C-Peptid, die als signifikant verschieden von Null (± 2 sd) unterschieden werden kann, war 0,01 pmol/ml. Standardkurven mit und ohne PEG-Fällung waren nach Abzug der jeweiligen unspezifischen Bindung vergleichbar.
Das C-Peptid von Seren gesunder Nichtdiabetiker (n = 15), nach einer nächtlichen Fastenperiode abgenommen, wurde mit und ohne PEG-Vorbehandlung bestimmt. Beide Assays ergaben vergleichbare Ergebnisse. Die Fastenwerte von Stoffwechselgesunden lagen zwischen 0.18 und 0.56 pmol/ml.

Seren von Patienten mit einer Diabetesdauer von mehr als 25 Jahren (n = 8) zeigten mit der PEG-Methode gemessen, tatsächliche Nullwerte. Zugabe dieser Nullseren zur Standardlösung des Radioimmunoassays führte sowohl mit als auch ohne PEG-Fällung zu keiner Änderung der Standardkurve.

2. Bestimmung des freien Insulins

Freies Insulin wurde nach der Polyäthylenglycolpräzipitation mit dem Radioimmunoassay-System RIA GNOST ^{R} Insulin PEG der Behringwerke AG bestimmt (19).

Pipettierschema der PEG-Vorbehandlung


200 ul 25 %iges PEG in Aqua dest
+ 200 ul Serum
Rütteln für 2 min bei Raumtemperatur
Zentrifugation für 2 min bei 10 000 x g
Überstand
Pellet verwerfen
RIA für Insulin

Die Standardlösungen des Radioimmunoassay-Systems wurden entsprechend den Patientenseren mit 25 % igem PEG in Aqua dest. vorbehandelt.

Überprüfung des PEG-vorbehandelten Radioimmunoassays für Insulin

Wie Serienuntersuchungen an Normalseren (n = 20) zeigten, enthält der Überstand nach PEG-Behandlung 96 $\pm$ 2 % des freien Insulins.
Um die Stabilität der Insulinbindung nach Behandlung mit PEG zu untersuchen, wurden die Seren von Diabetikern und Stoffwechselgesunden mit ^{125}J-markiertem Insulin inkubiert. Die Seren wurden mit PEG gefällt und nach der Zentrifugation wurde die Radioakti-

vität der resultierenden Präzipitate und Überstände gezählt. Die Präzipitate wurden anschließend in einer PEG-Lösung wieder aufgelöst, für 10 min bei 4°C geschüttelt und zentrifugiert. Die Radioaktivität des Überstandes wurde im Gammazähler gemessen. Dieses Verfahren wurde wiederholt, nachdem eine erneute Mischung aus PEG-Lösung und Präzipitat für 20 min geschüttelt worden war. Dieses wiederholte Waschen und Präzipitieren führte zu keiner signifikanten Dissoziation gebundenen Insulins vom Pellet in den Überstand.
Ein elektrophoretischer Vergleich zwischen einem antikörperhaltigen Serum vor und nach PEG-Fällung (25 % ige Lösung) zeigte, daß die PEG-Behandlung zu einer vollständigen Abtrennung der Gamma-Globulinfraktion führt. Weiterhin wies der Überstand nach PEG-Präzipitation keine Bindungsfähigkeit für zugesetztes ^{125}J-markiertes Insulin auf.

3. Bestimmung des Gesamt-Insulins

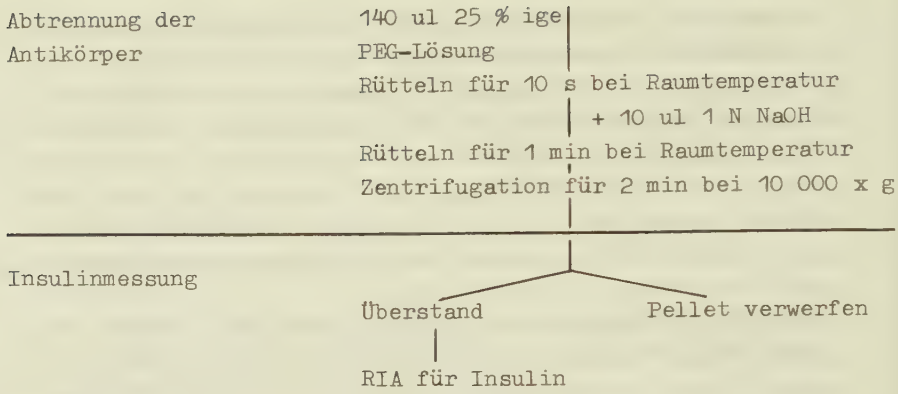
Gesamt-Insulin wurde entsprechend der Methode von Kuzuya (39) mit geringfügigen Abänderungen bestimmt (19).

Pipettierschema der Abtrennung des Insulins vom Insulinantikörper

100 ul Serum wurden mit 0,02 ml 1 N HCl bis zum pH 2,5 angesäuert und 60 min bei Raumtemperatur gerüttelt. 0,14 ml 25 % iges PEG (in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4) wurde hinzugefügt, für ca. 10 s geschüttelt und unmittelbar danach 0,01 ml 1 N NaOH zugegeben. Nach Rütteln für 1 min bei Raumtemperatur wurde der Ansatz 2 min lang bei 10 000 x g zentrifugiert.

Schema nach Gerbitz (61)

Aufsprengen der Insulin- Antikörperkomplexe	100 ul Serum Rütteln für 60 min bei Raumtemperatur	+ 20 ul 1 N HCl


Abtrennung der Antikörper
140 ul 25 % ige PEG-Lösung
Rütteln für 10 s bei Raumtemperatur
+ 10 ul 1 N NaOH
Rütteln für 1 min bei Raumtemperatur
Zentrifugation für 2 min bei 10 000 x g
Insulinmessung
Überstand
Pellet verwerfen
RIA für Insulin

Das Pellet wurde verworfen, und der Überstand mit dem Radioimmunoassay-System RIA GNOST ^{R} Insulin PEG gemessen. Wie bei der Bestimmung des freien Insulins, wurden auch beim Gesamt-Insulin die Standardlösungen mit PEG vorbehandelt. Wie in Versuchen mit ^{125}J-markiertem Insulin gezeigt werden konnte, enthält der Überstand nach PEG-Fällung bei NaOH-Zugabe 95 $\pm$ 2 % (n = 10) des Gesamt-Insulins.

4. Charakterisierung der Insulinantikörper

Die Bindungsparameter der Insulinantikörper, die Bindungskapazität und die Assoziationskonstante wurden mit der Methode nach K.-D. Gerbitz und W. Kemmler (19) bestimmt.

Herstellung der sauren Dextran-Kohle Citratpufferlösung und des Nullserums

Lösung 1: Citratpuffer und Zellulose
3,15 g Zitronensäure wurden in 90 ml Aqua dest. gelöst und mit 1 N NaOH auf den pH 2,2 eingestellt. Anschließend wurde der Puffer mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt. 0,1 g Dimethylaminoäthanol-Zellulose wurden auf die Oberfläche des Puffers aufgetragen. Nach einer Stunde wurde das entstandene Gemisch vorsich-

tig umgerührt. Der pH-Wert sollte bei 2,5 sein, war er erhöht, wurde vorsichtig zurücktitriert.

Lösung 2: Kohle Norit GSX und Dextran T 70
12 g der Kohle wurden mehrfach mit Aqua dest. gewaschen, bis keine Kohleschwebeteilchen mehr im Überstand zu sehen waren. Danach wurde mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt und langsam Dextran T 70 zugegeben. Die Suspension wurde für ca. 10 min vorsichtig gerührt.

Lösung 3: Saure Dextran-Kohle Citratpufferlösung
Lösung 1 und 2 wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt und vorsichtig für 15 min gerührt. Der pH-Wert sollte bei 2,5 sein.

Das Nullserum (insulinfreies Serum) wurde von stoffwechselgesunden Probanden, die wenigstens für 48 h gefastet hatten, erhalten. Die Seren der einzelnen Probanden wurden zusammengegeben und bei - 25°C aufbewahrt, nachdem sie für sechs Stunden bei 56°C erhitzt worden waren, um Spuren einer Insulinase zu beseitigen (62).

Herstellung der Verdünnungsreihe des "kalten" Insulins

Stammlösung:
P = 200 mM Phosphatpuffer pH 7,4

1) 1250 mU/ml : 1 ml P + 1 ml Stammlösung
2) 250 mU/ml : 1,8 ml P + 0,2 ml Stamml.
3) 125 mU/ml : 1,8 ml P + 0,2 ml aus 1)
4) 50 mU/ml : 2 ml P + 0,5 ml aus 2)
5) 25 mU/ml : 1,8 ml P + 0,2 ml aus 2)
6) 12,5 mU/ml : 1,8 ml P + 0,2 ml aus 3)
7) 5 mU/ml : 1,8 ml P + 0,2 ml aus 4)
8) 2,5 mU/ml : 1,8 ml P + 0,2 ml aus 5)
9) 1,25 mU/ml : 1,8 ml P + 0,2 ml aus 6)
10) 0,5 mU/ml : 1,8 ml P + 0,2 ml aus 7)
11) 0,125 mU/ml: 1,8 ml P + 0,2 ml aus 9)
12) 2 ml 200 mM Phosphatpuffer pH 7,4

Pipettierschema der Antikörpercharakterisierung

Abtrennung des freien und des antikörpergebundenen Insulins	1,5 ml Serum +	1,5 ml saure Dextran-Kohle Citratpufferl.
	10 min bei Raumtemp. rütteln	
	Zentrifug. für 2 min bei 10 000 x g	
	0,1 ml Überstand	Pellet verwerfen
Titrierung des Insulinantikörpers mit kaltem Insulin und Zugabe einer konst. Konzentration an ^{125}J-markiertem Insulin (2-5 x 10^4 cpm)	+ 0,1 ml "kaltes" Insulin (verschiedene Konzentrationen s. Verdünnungsr.)	
	+ 0,1 ml ^{125}J-markiertes Insulin in 200 mM. Phosphatpuffer pH 7,4	
Abtrennung des freien, "kalten" Insulins und des freien ^{125}J-markierten Insulins Messung des antikörpergebundenen, markierten Insulins im Pellet	+ 0,2 ml Nullserum	
	Inkubation für 2 h bei 37°C	
	+ 0,5 ml PEG (250 mg / ml 200 mM Phosphatpuffer pH 7,4)	
	Schütteln für 10 s	
	Zentrifugation für 2 min bei 10 000 x g	
	Überstand verwerfen	Pellet im Gamma-Zähler messen

Bestimmung der Bindungsparameter

Die Bindungsparameter (Ab = Bindungskapazität; K = Assoziationskonstante) wurden bestimmt, indem die Antikörper nach Ansäuerung mit zunehmenden Konzentrationen an "kaltem" Insulin

($1{,}5 \times 10^{-10}$ bis 10^{-6} mol/l) und mit konstanten Konzentrationen an ^{125}J-markiertem Insulin (2 bis 5×10^{4} cpm) bei 37°C für 2 h inkubiert wurden. Nach der Inkubation der Proben wurde mit PEG gefällt, zentrifugiert und die Radioaktivität des Niederschlages bestimmt. Die Konzentration von freiem und gebundenem Insulin wurde entsprechend der Formel:

$$g = cpm_A - cpm_N$$

$$f = G - g$$ berechnet.

g = gebundenes ^{125}J-markiertes Insulin
cpm_A = Insulin, das in antikörperhaltigen Seren gebunden wurde
cpm_N = Insulin, das im Nullserum gebunden wurde
G = Gesamt-Insulin (gesamtes ^{125}J-markiertes Insulin, das pro Serum in den Ansatz eingegeben wurde)
f = freies ^{125}J-markiertes Insulin

Um die Bindungsparameter der insulinbindenden Antikörper zu berechnen, wurde der Scatchard-plot benutzt (63 / 64). Die Konzentration der gebundenen / freien Liganden wird hierbei gegen die Konzentration des gebundenen Liganden aufgetragen. Im Falle einer nicht dissoziierbaren, nicht kooperativen Bindungsstelle, ergibt die Auftragung eine Gerade mit der Steigung von -K und einer Kreuzung der Abszisse bei Ab° (= maximale Bindungskapazität). Eine Abweichung von dieser Gerade in Form einer konkaven Kurve wurde als das Überlappen von mindestens zwei unabhängigen Bindungsstellen interpretiert. Diese konkave Kurve wurde auch bei der Auftragung der gebundenen und freien Liganden (des gebundenen und freien Insulins) des Scatchard-plots von Insulinantikörpern angetroffen (19 / 65). Dies führte zum Modell von zwei verschiedenen Insulinantikörperpopulationen mit einer hohen, bzw. niedrigen Affinität für Insulin. Entsprechend diesem Modell wurden in der vorliegenden Arbeit die "high" und "low affinity" Komponenten (Ab_1, Ab_2, K_1, K_2) der beiden hypothetischen Insulinantikörperpopulationen nach Kerp et al. (65) in den Seren der einzelnen Diabetiker bestimmt.

Wie bereits von Baxter et al. (51) gezeigt, ist die Computer Analyse von Scatchard-plots mit der "limiting slope technique",

die von Hunston (66) beschrieben wurde, geeignet, die Bindungsparameter von insulinbindenden Antikörpern zu berechnen. Mit Hilfe eines derartigen Computerprogrammes, wurden in der vorliegenden Arbeit die "high" und "low affinity" Parameter aus den jeweiligen Scatchard-plots bestimmt.

5. Die Serumglucose wurde enzymatisch nach der Glucose-Dehydrogenase-Methode (67) bestimmt.

6. Alanin wurde unter Verwendung der Alanin-Dehydrogenase gemäß der Methode von Williamson et al. (68) gemessen.

7. Laktat wurde im Hoffmann-La Roche lactate analyzer 640 unter Verwendung von Cytochrom b_2 der Bäckerhefe bestimmt.

8. Die freien Fettsäuren (FFS) wurden entsprechend der von Duncombe (69) beschriebenen Methode bestimmt.

9. Statistische Methoden

Korrelationen zwischen den Wertepaaren wurden vermittels des Student's t-test auf Signifikanz untersucht.
Für paarige und unpaarige Stichproben wurde der Wilcoxon-Paardifferenzen-Test verwendet.

Ergebnisse

Vorbemerkung zur Auswahl der Patienten hinsichtlich ihres Alters bei Diabetesbeginn und zur Einteilung der Patienten in verschiedene Gruppen

Die in dieser Arbeit getroffene Auswahl von Patienten, deren Erstmanifestation des Diabetes vor dem 40. Lebensjahr auftrat, beruht vornehmlich auf der bekannten klinischen Beobachtung, daß Patienten, die erst im höheren Lebensalter an Diabetes erkranken, meist übergewichtig sind, einen milden Diabetesverlauf haben und, wenn überhaupt, erst nach Jahren insulinbedürftig werden. Im Gegensatz hierzu zeigen Diabetiker, die in jungen Jahren erkranken, oft einen akuten, dramatischen Beginn des Diabetes. Sie sind gleich zu Anfang, oder zumeist nach Monaten, insulinpflichtig. Vor der Manifestation sind sie in der Regel unter- oder normalgewichtig.

Neben diesen klinischen Merkmalen, ergaben sich aus einer Reihe von Untersuchungen, Hinweise für einen genetisch bedingten Unterschied zwischen Diabetikern vom juvenilen Typ (Typ I nach 70 / 71) und Altersdiabetikern (Typ II nach 70 / 71).

- In Zwillingsstudien zeigte sich bei Altersdiabetikern eine signifikant höhere Konkordanz des Diabetes (ca. 90 %). Manifestierte sich der Diabetes vor dem 40. Lebensjahr war es seltener (ca. 50 %), daß beide Zwillinge an Diabetes erkrankten (72).

- Von verschiedenen Autoren (73 / 74 / 75 / 76 / 77) wurde eine signifikant erhöhte Häufigkeit der Histokompatibilitätsantigene HLA B8, BW 15, B18, CW 3, DW 3 und DW 4 in Diabetikern vom juvenilen Typ, nicht jedoch in Altersdiabetikern angetroffen

- Zellvermittelte Immunreaktionen gegen Oberflächenantigene von B-Zellen konnten nur bei insulinabhängigen juvenilen Diabetikern nachgewiesen werden (Übersicht bei 78).

Eine klare Unterscheidung zwischen Alters- und juvenilen Diabetikern aufgrund des Alters bei Erstmanifestation der diabetestypischen Symptome ist jedoch nicht möglich.
So ist bekannt, daß manche Menschen auch nach dem 40. Lebensjahr einen Diabetes mit der vollen Symptomatik des juvenilen Diabetes entwickeln können. Ebenso wird in der Literatur (Übersicht bei 71) zunehmend über Fälle von Diabetes bei Juvenilen berichtet, deren Erkrankung alle Charakteristiken des Alters- oder Typ II Diabetes in sich birgt (MODY = maturity onset diabetes of the youth). Eine klare Abgrenzung der beiden Diabetestypen voneinander wird zusätzlich dadurch erschwert, daß sie in sich heterogen sind, und fließende Übergänge zwischen Typ I und Typ II vorkommen können.

Es gibt HLA B 8 Antigene nicht nur bei juvenilen Diabetikern, sondern sie sind auch bei Altersdiabetikern anzutreffen. Wie beim juvenilen Diabetiker finden sich beim Altersdiabetiker, verbunden mit dem Vorkommen von HLA B 8 Antigenen, gehäuft Inselzellantikörper. Altersdiabetiker, die HLA B 8 Antigene und Inselzellantikörper aufwiesen, zeigten eine signifikante Tendenz, später insulinpflichtig zu werden (79).
Bei juvenilen Diabetikern wurden Unterschiede im Auftreten einer Mikroangiopathie, in der Bildung von Inselzellantikörpern und Antikörpern gegen exogenes Insulin gefunden, die jeweils mit HLA B 8 bzw. BW 15 Antigenen assoziiert waren (Übersicht bei 81).
All dies läßt vermuten, daß es sich beim idiopathischen Diabetes mellitus nicht um eine spezifische Krankheit handelt, sondern um ein Syndrom, das sich aus einer Vielfalt von Erkrankungen zusammensetzt, die alle in ein ähnliches klinisches Bild münden.

In dieser Arbeit wurde zwar mit der Unterscheidung zwischen Typ I und Typ II Diabetikern vermieden, die Werte von Diabetikern, bei denen grobe Unterschiede im Diabetestyp zu erwarten sind, gemeinsam statistisch auszuwerten - eine wahrscheinlich bestehende Heterogenität des Diabetestyps innerhalb der Typ I Diabetiker, konnte freilich nicht berücksichtigt werden.

Die gemäß den bestimmten Parametern (C-Peptid, freies und antikörpergebundenes Insulin, Laktat, Alanin und freie Fettsäuren) unterschiedlichen Fragestellungen bei der Auswertung, erforderten beim Kollektiv der 20 Diabetiker vom juvenilen Typ, die Bildung von Untergruppen.
Für eine sinnvolle Auswertung der C-Peptidergebnisse war es nötig, zwischen Patienten mit und ohne C-Peptid zu unterscheiden. Dies führte zu zwei Gruppen von acht bzw. zwölf Diabetikern.
Die Messung des freien Insulins zeigte, daß drei Diabetiker, im Vergleich zum übrigen Kollektiv und insbesondere zu Stoffwechselgesunden, über außerordentlich hohe Serumkonzentrationen an freiem Insulin verfügten. Aus der Bestimmung des gebundenen Insulins ergab sich, daß ein Diabetiker noch keine signifikante Konzentration an insulinbindenden Antikörpern entwickelt hatte. Diese vier Diabetiker waren somit in Hinblick auf ihre Serumspiegel an freiem Insulin und die in einem Fall noch nicht eingetretene Antikörperbildung gegen Insulin, Sonderfälle innerhalb des Kollektivs.
Aus diesem Grunde wurde bei der Auswertung der Ergebnisse des freien Insulins, neben dem gesamten Kollektiv, auch das um die vier Patienten verminderte Kollektiv untersucht.
Die Auswertung der Ergebnisse aus der Bestimmung des gebundenen Insulins erfolgte aus einsehbaren Gründen nur anhand der Insulinwerte von 19 der 20 Diabetiker.

1. Ergebnisse aus der Bestimmung der Serumglucose

Abbildung 3 zeigt das 24^h-Profil der Serumglucosewerte aller zwanzig Patienten. Die Glucosewerte liegen zu den einzelnen Abnahmezeiten stets über 177 mg/dl, der höchste Wert der Kurve ist bei 271 mg/dl und der Mittelwert der gesamten Kurve beläuft sich auf 216 mg/dl. Bei stoffwechselgesunden Probanden würde die mittlere Glucosekonzentration über einen vergleichbaren Zeitraum bei 80 mg/dl liegen und Werte von 150 mg/dl nicht überschreiten (54). Abbildung 4 vermittelt einen Eindruck von der feinen Glucoseregulierung bei Nichtdiabetikern.
Der Verlauf der Glucosekurve der 20 Diabetiker legt sowohl eine Abhängigkeit der Serumglucose von den eingenommenen Mahlzeiten als auch von den Insulingaben nahe. So zeigt das 24^h-Profil der Serumglucose nach den Mahlzeiten um ($\pm$ 15 min) 13.45, 15,45 und 17.45 Uhr einen gleichmäßigen Anstieg der Serumglucose bis 18.00 Uhr. Der Anstieg zwischen 14.00 und 18.00 Uhr ist signifikant ($p < 0{,}01$). Einer weiteren Mahlzeit um 19.30 Uhr folgte kein Glucoseanstieg. Dies könnte auf die Wirkung der Insulingabe, die um 16.30 Uhr erfolgte, zurückzuführen sein. Hinsichtlich der morgendlichen Insulingabe um 07.00 Uhr läßt sich die gleiche Überlegung anstellen. Dementsprechend besteht zwischen den um 08.00 Uhr und 12.00 Uhr bestimmten Glucosewerten nur ein minimaler Unterschied, obwohl in dieser Zeit von den Patienten zwei Mahlzeiten eingenommen wurden.
Anscheinend ist die Glucose des Diabetikers wesentlich gröber moduliert als es beim Nichtdiabetiker der Fall ist. Die 24^h-Profile der Serumglucose der einzelnen Patienten führen zur selben Annahme.
Die einzelnen MAGE, MBG, M-value und Labilityindexwerte der 20 Diabetiker sind in Tabelle 3 aufgeführt.
Mit der Tabelle 4 wurde versucht, eine Einteilung der Patienten nach der Güte ihrer Diabeteseinstellung vorzunehmen. Den besser eingestellten Patienten sind die niedrigeren Rangzahlen zugeordnet. Beispielsweise wurde bezüglich des MAGE demjenigen Diabetiker die niedrigste Rangzahl zugeordnet, der innerhalb des Kollektivs den niedrigsten MAGE aufwies. Aus vier Rangzahlen, die

sich für die einzelnen Patienten aus der jeweiligen Höhe der MBG, MAGE, M-value und Labilityindexwerte ergaben, wurde das arithmetische Mittel gebildet. Entsprechend den derart ermittelten Werten (von 2,75 bis 17) erfolgte in Tabelle 4 die Einteilung der Patienten nach der Güte ihrer Gluçoseeinstellung.

Tabelle 3

Parameter der Glucoseeinstellung

Initialen	MBG mg/dl	MAGE mg/dl	M-value	Lability-index g/24 h
O. F.	205	201	57	94
R. H.	226	248	94	-
C. B.	294	150	102	65
B. L.	344	242	140	-
P. P.	265	198	90	184
A. J.	272	188	129	228
E. B.	172	159	48	63
E. M.	289	147	116	131
L. S.	182	114	51	109
W. D.	333	266	226	121
M. G.	174	148	43	21
M. S.	329	138	140	131
R. B.	193	137	57	62
I. F.	96	62	51	36
J. W.	102	102	51	7
E. R.	171	237	59	8
V. G.	163	248	63	53
H. E.	179	79	35	9
J. E.	133	152	36	100
B. G.	198	200	57	43

Tabelle 4

Rangzahlen der Glucoseeinstellung

Initialen	MBG	MAGE	M-value	Labilityindex	Rangzahlen	
J. W.	2	3	5	1	2,75	1
I. F.	1	1	5	5	3	2
H. E.	8	2	1	3	3,5	3
M. G.	7	8	3	4	5,5	4
J. E.	3	10	2	11	6,5	5
R. B.	10	5	6	7	7	6
E. B.	6	11	4	8	7,25	7
E. R.	5	16	7	2	7,5	8
L. S.	9	4	5	12	7,5	9
V. G.	4	18	8	6	9	10
B. G.	11	14	6	6	9,25	11
O. F.	12	15	6	10	10,75	12
C. B.	17	9	11	9	11,5	13
E. M.	16	7	12	14	12,25	14
P. P.	14	13	9	15	12,75	15
M. S.	18	6	14	14	13	16
R. H.	13	18	10	-	13,7	17
A. J.	15	12	13	16	14	18
W. D.	19	19	15	13	16,5	19
B. L.	20	17	14	-	17	20

Abbildung 3

24^h-Profil der Serumglucose der 20 insulinbehandelten Diabetiker

▮ = Mahlzeiten; ▲ = Insulingaben

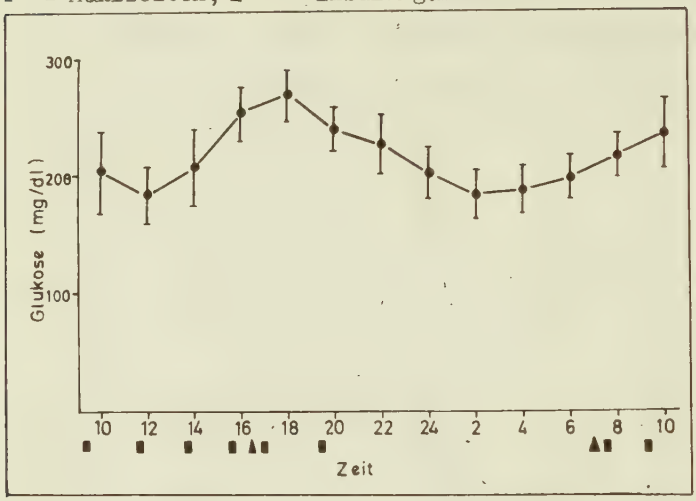
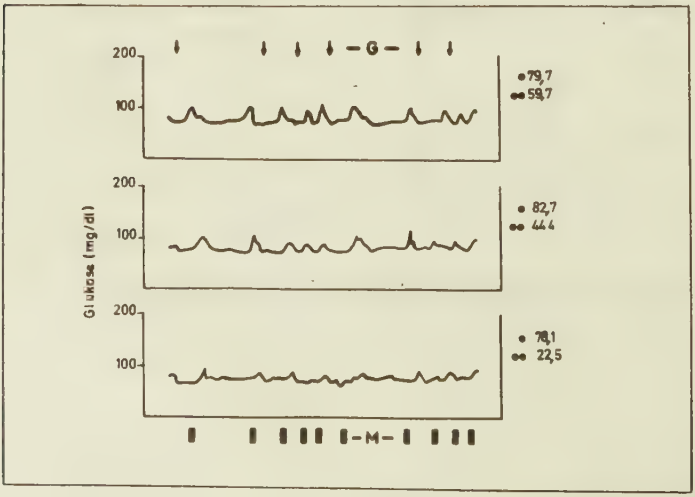


Abbildung 4

48^h-Profile der Blutglucose von drei stoffwechselgesunden Probanden. Die Profile wurden über eine kontinuierliche Blutglucoseanalyse erhalten.

M = Mahlzeiten; G = Gymnastik; • = MBG (mg/dl); •• = MAGE (mg/dl)
Die Abbildung wurde einer Arbeit von Service et al. (54) entnommen.



2. Ergebnisse aus der Bestimmung des C-Peptides

8 der 20 in der Studie untersuchten Diabetiker vom juvenilen Typ wiesen meßbares C-Peptid auf. Die Diabetesdauer der acht Patienten mit C-Peptid lag zwischen einem Monat und 16 Jahren ($\bar{x}$ = 3,6; sd = 5,2 Jahre), die Dauer der Insulinbehandlung war zwischen fünf Tagen und 13 Jahren ($\bar{x}$ = 2,5; sd = 4,5 Jahre). Bei sechs der acht Diabetiker mit C-Peptid setzte die Insulinbehandlung einen Monat bis drei Jahre nach Auftreten der ersten Symptome des Diabetes mellitus ein. Dagegen wurde bei elf der Diabetiker ohne B-Zellrestfunktion die Insulinbehandlung bereits bei Diabetesbeginn eingeleitet (s. Tab. 1).

Sowohl die Dauer des Diabetes als auch der Insulinbehandlung lagen bei den Diabetikern ohne C-Peptid signifikant ($p < 0,01$) höher als bei den Diabetikern mit C-Peptid. Mit Ausnahme der Diabetikerin E.R. hatten alle Diabetiker mit C-Peptid eine kürzere Diabetesdauer als fünf Jahre. Hingegen bestand bei 75 % der Patienten ohne residuale B-Zellfunktion der Diabetes seit mehr als fünf Jahren. So erstreckte sich die Diabetesdauer bei der Gruppe ohne B-Zellrestfunktion zwischen einem und 33 Jahren ($\bar{x}$ = 14,2; sd = 11,2 Jahre). Die Dauer der Insulinbehandlung lag im selben Bereich.
Das Alter bei Auftreten der Erstsymptomatik des Diabetes lag beim Kollektiv mit C-Peptid zwischen dem 16. und 37. Lebensjahr ($\bar{x}$ = 25,8; sd = 7,4). Es war damit im Mittel höher als bei den Diabetikern ohne residuale C-Peptidsekretion ($\bar{x}$ = 16,8; sd = 7,7). Dieser Unterschied ist signifikant ($p < 0,05$).

Die verabreichte Insulindosis während der 24 stündigen Abnahmeperiode war zwischen 20 und 60E Insulin für die Diabetiker mit einer B-Zellrestfunktion ($\bar{x}$ = 39 E; sd = 13,2 E). Die zwölf Patienten ohne C-Peptid wurden mit einer Dosis, die zwischen 20 und 82 E lag, therapiert ($\bar{x}$ = 43,8; sd = 20,7 E). Sie lag damit im Durchschnitt höher, unterschied sich jedoch nicht signifikant von der Dosis des Kollektivs mit einer restlichen B-Zellfunktion. Das Verhältnis zwischen den Insulindosiswerten beider Gruppen bleibt unverändert, auch wenn bei jedem Diabetiker das

Körpergewicht in kg durch den Insulinbedarf dividiert wird. Die Mittelwerte, die sich dabei ergeben sind: $\bar{x}$ = 0,62; sd = 0,2 E / kg / 24h; für die Gruppe mit C-Peptid und $\bar{x}$ = 0,73; sd = 0,29 E / kg / 24h für die Gruppe ohne C-Peptid. Bei diesem Vergleich der Insulindosis der Patienten mit und ohne C-Peptid wurde bisher außer Acht gelassen, daß zwei Diabetiker der Gruppe ohne B-Zellreserve eine eingeschränkte Nierenfunktion zum Zeitpunkt des Abnahmetages hatten (s. Tab. 2). Bei diesen Patienten ist aufgrund der erhöhten Kreatininwerte im Serum (R.H. - Crea.: 5,61 mg/dl; B.L. - Crea. Clearance: 40 ml/min), ein gegenüber der Norm verminderter Insulinbedarf anzunehmen. Tatsächlich erhielten beide Patientinnen (R.H. und B.L.) mit 20 bzw. 22 E Insulin pro Tag eine relativ geringe Substitution. Auch wenn die beiden Diabetikerinnen nicht in den Vergleich miteinbezogen werden, ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen bezüglich der Insulindosis.

Die mittleren C-Peptid-Immunoreaktivitätswerte (CPI) - die Mittelwerte sind aus den 11 bis 13 Einzelwerten der 24^h-Abnahmeperiode berechnet - der acht Diabetiker mit C-Peptid lagen zwischen 0,01 und 0,33 pmol/ml (s. Tab. 5).
Bei den acht Patienten fand sich eine signifikante Korrelation zwischen den CPI- und den Serumglucosewerten ($p < 0{,}05$ - $p < 0{,}001$; s. Tab. 5). Zwischen den beiden Summenkurven der CPI- und Glucosewerte aller acht insulinabhängigen Diabetiker bestand ebenfalls eine signifikante positive Korrelation. Aus den Abb. 6 u. 8 kann die Ähnlichkeit des Verlaufes der 24^h-Profile des C-Peptides und der Serumglucose ersehen werden. Dies läßt auf eine Abhängigkeit der C-Peptidsekretion von der Konzentration der Serumglucose schließen. Dem entspricht auch, daß, wie aus den einzelnen Abbildungen ersichtlich, zwar auf die eingenommenen Mahlzeiten häufig ein Anstieg des C-Peptides erfolgte, dieser jedoch vormittags und mittags gemäß dem Glucoseverhalten unterblieb. Für eine, bei den einzelnen Patienten verzögert auf den Glucosereiz erfolgende B-Zellsekretion ergibt sich aus den Einzelkurven in Abb. 81 - 88 kein Anhaltspunkt.

Das Ausmaß der Ähnlichkeit des Verlaufes von C-Peptid und Serumglucose scheint nicht von der Höhe des C-Peptidspiegels abzuhängen, in dem Sinne, daß eine größere B-Zellreserve keineswegs mit einem besseren Ansprechen auf einen Glucosestimulus einhergeht. Dies zeigt sich darin, daß die Signifikanz der Korrelationskoeffizienten r von C-Peptid und Glucose (= Ausmaß der Ähnlichkeit der 24^h-Profile beider Parameter) der drei Diabetiker mit der geringsten B-Zellfunktion (R.B., I.F. und J.E.), dem Signifikanzniveau der Korrelationskoeffizienten r der anderen fünf Diabetiker nicht nachsteht (s. Tab. 5). Mit anderen Worten heißt dies, daß die Stimulierbarkeit der B-Zellfunktion durch Glucose unabhängig von der Größe der B-Zellreserve ist.
Beim insulinbehandelten Diabetiker scheint die C-Peptidsekretion nicht allein starr nach der absoluten Höhe der jeweiligen momentanen Serumglucosekonzentration moduliert zu werden, sondern sich zusätzlich auf den bestehenden Spiegel der Glucosewerte über den Tagesverlauf einzustellen. So stellten bei einer relativ eng um einen Glucosespiegel von 100 mg/dl eingestellten Diabetikerin (J.W.) mit einer noch beträchtlichen C-Peptidsekretion (CPI über 24 h: 0,17 pmol/ml), Glucosewerte um 50 mg/dl einen geringen Sekretionsreiz für die B-Zellen dar (entsprechende CPI: 0,01 pmol/ml). Hingegen sezernierte der Patient H.E., dessen Serumglucose im Mittel um 180 mg/dl schwankte und der eine mittlere CPI von 0,33 pmol/ml aufwies, bereits bei Glucosewerten um 100 mg/dl kaum mehr C-Peptid (CPI: 0,02 pmol/ml).

Die Korrelationen der Parameter der Glucoseeinstellung, der Insulindosis, der Dauer der Insulinbehandlung und des Diabetes mit der mittleren CPI der acht Diabetiker erreichten das vorgegebene Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nicht. Anzumerken ist, daß die negative Korrelation zwischen der mittleren CPI und der Insulindosis / kg / 24h nur um einen minimalen Betrag unterhalb des Signifikanzniveaus lag.

Die vorliegende Arbeit erbrachte den Hinweis, daß eine noch vorhandene B-Zellreserve eine günstige Auswirkung auf die Glucose-

einstellung des insulinbehandelten Diabetikers hat.
Beim statistischen Vergleich der Parameter der Glucoseeinstellung der beiden Gruppen mit und ohne C-Peptid hatten die Patienten mit einer B-Zellrestfunktion signifikant niedrigere Werte für den M-value ($p < 0,05$), die mittlere Blutglucosekonzentration (MBG) ($p < 0,001$) und den Labilityindex ($p < 0,01$). Der mittlere MAGE der Gruppe mit C-Peptid war zwar mit 152 mg/dl niedriger als derjenige, der Gruppe ohne residuale B-Zellfunktion mit 183 mg/dl, doch war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Mittelwerte und Standardabweichung der Parameter der Diabeteseinstellung beider Gruppen können aus Tabelle 6 ersehen werden. Eine bessere Glucoseeinstellung der Gruppe mit C-Peptid ist auch aus der Abbildung 7 ersichtlich. Dort sind die Glucosewerte der zwei Gruppen als Summenkurven dargestellt. Die Kurven sind an acht der dreizehn Abnahmezeiten signifikant unterschiedlich. Derart deutliche Unterschiede im Verhalten der Serumglucose zwischen den beiden Kollektiven bedeuten jedoch nicht zwangsläufig eine schlechtere Einstellung für den einzelnen Diabetiker ohne B-Zellfunktion im Vergleich zum Diabetiker mit dieser Funktion. So lagen die MAGE, M-value und MBG-Werte von zwei Diabetikern ohne C-Peptid - M.G. und E.B. - niedriger als die Werte der nämlichen Parameter des Diabetikers B.G., der über eine B-Zellrestfunktion verfügte. Gleiches gilt für die MAGE, M-value und Labilityindexwerte von M.G., im Vergleich zu den Werten des Patienten E.R., der ebenso wie B.G. noch eine beträchtliche Konzentration an C-Peptid zur Abnahmezeit dieser Studie aufwies. Bei aller Vorsicht der Interpretation der Einstellungsrangzahlen von Tabelle 4, vermittelt doch ein Blick auf diese Zahlen den gleichen Eindruck. Immerhin weisen gemäß diesen Zahlen drei Diabetiker ohne C-Peptid eine bessere Diabeteseinstellung auf als zwei der Patienten mit einer residualen C-Peptidsekretion. Andererseits finden sich nach den Kriterien der Diabeteskontrolle von Service et al. (54) nur unter der Gruppe mit C-Peptid, Diabetiker mit einer stabilen Glucoseeinstellung. Service et al. postulierten einen MAGE von unter 100 mg/dl als Maß für eine stabile Stoffwechseleinstellung. Diesem Kriterium genügten nur die

MAGE-Werte der Diabetiker I.F. (62 mg/dl) und H.E. (79 mg/dl). Als Grenzwert mag noch der MAGE der Patientin J.W. (102 mg/dl) gelten. Alle drei Diabetiker verfügten über eine residuale B-Zellfunktion, die bei mittleren CPI-Werten von 0,03 pmol/ml (I.F.), 0,17 pmol/ml (J.W.) und 0,33 pmol/ml (H.E.) sehr unterschiedlich war.

Abschließend läßt sich über den Zusammenhang zwischen der B-Zellrestfunktion und der metabolischen Kontrolle bezogen auf das Kollektiv der zwanzig Diabetiker feststellen: Diabetiker mit C-Peptid sind als Gruppe besser eingestellt als Diabetiker ohne C-Peptid. Manche Patienten ohne eine derartige Inselzellfunktion zeigten jedoch eine vergleichbare oder sogar bessere Diabeteseinstellung als Diabetiker mit einer residualen Insulinsekretion.

Ein interessanter Befund sei hier angefügt, dessen Diskussion im Zusammenhang mit den Erkenntnissen, die aus der Bestimmung des C-Peptides gewonnen wurden, erforderlich erscheint.

Diabetiker mit einer längeren Diabetesdauer oder Dauer der Insulinbehandlung waren nach der Mehrzahl der verwendeten vier Parameter der Stoffwechseleinstellung in der Regel schlechter eingestellt, als diejenigen, deren Diabetes sich erst vor wenigen Jahren oder gar Monaten manifestiert hatte. Die Korrelationen zwischen der Diabetesdauer und den Parametern der Stoffwechseleinstellung ergaben signifikant positive Korrelationskoeffizienten für den MAGE: $r = 0,4878$; $p < 0,05$ - für den MBG-Wert: $r = 0,5677$; $p < 0,01$ - und für den M-value: $r = 0,6013$; $p < 0,005$. Die Labilityindexwerte korrelierten nicht signifikant mit der Diabetesdauer. Desgleichen bestanden bei den 20 Diabetikern signifikante Korrelationen zwischen der Dauer der Insulintherapie und den MAGE-Werten: $r = 0,4905$; $p < 0,05$ - den MBG-Werten: $r = 0,5804$; $p < 0,01$ - und den M-values: $r = 0,6223$; $p < 0,005$. Für den Zusammenhang zwischen den Dauer der Insulinbehandlung und den Labilityindexwerten gilt das gleiche wie für die Diabetesdauer.

Tabelle 5

CPI-Werte der acht Diabetiker mit C-Peptid

Initialen	CPI (pmol/ml) Mittelwert	Bereich	Korrelationskoeffizienten CPI/Glucose	
H. E.	0,33	0,02 - 0,75	0,84	$p < 0,001$
G. B.	0,24	0,15 - 0,31	0,56	$p < 0,05$
J. W.	0,17	0,01 - 0,35	0,78	$p < 0,01$
E. R.	0,14	0,06 - 0,36	0,58	$p < 0,05$
V. G.	0,12	0,06 - 0,18	0,73	$p < 0,01$
R. B.	0,03	0,00 - 0,06	0,96	$p < 0,001$
I. F.	0,03	0,00 - 0,07	0,93	$p < 0,001$
J. E.	0,01	0,00 - 0,02	0,75	$p < 0,01$
Mittelwert	0,13		0,77	
Bereich	0,01 - 0,33		0,56 - 0,96	

Tabelle 6

Mittelwerte und Standardabweichung der vier verwendeten Parameter der Glucoseeinstellung

Parameter		Diabetiker mit C-Peptid	Diabetiker ohne C-Peptid
MBG	$\bar{x}$	154	257
	sd	39,6	63,7
M-value	$\bar{x}$	51	103
	sd	10,4	52,6
MAGE	$\bar{x}$	152	183
	sd	70,6	48,7
Lability-index	$\bar{x}$	40	115
	sd	32,4	60,2

Abbildung 5

Alter bei Diabetesbeginn und Dauer der Insulinbehandlung der Diabetiker mit und ohne C-Peptid

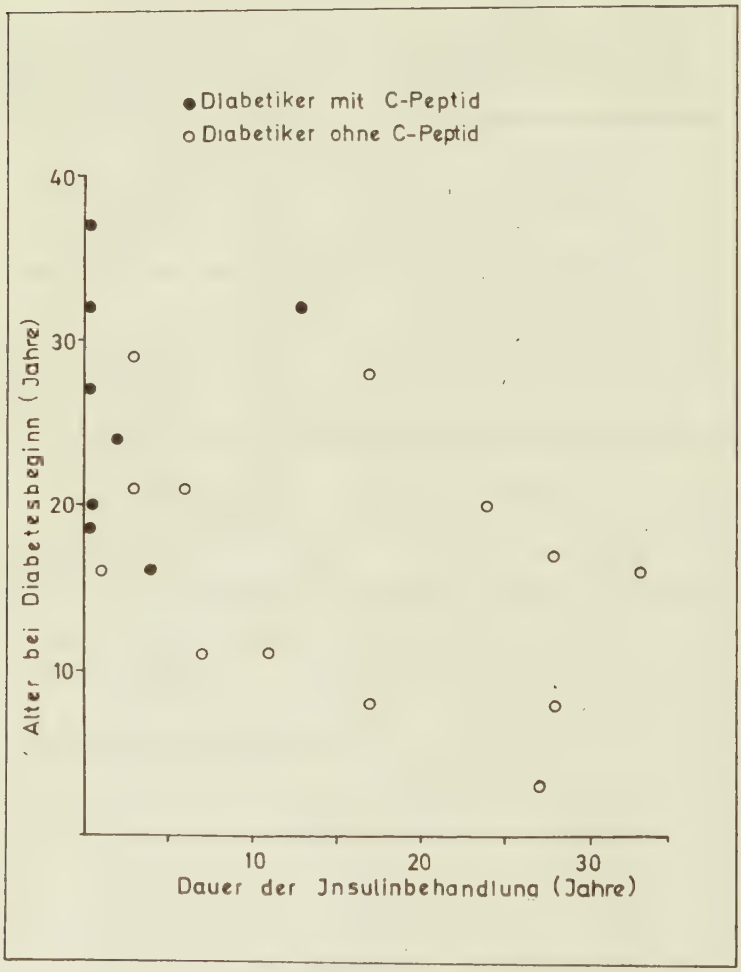


Abbildung 6

24^{h}-Profile des Serum C-Peptides und der Serumglucose der acht Diabetiker mit einer residualen B-Zellfunktion

Mittelwerte ± S.E.M.; BE = Broteinheiten

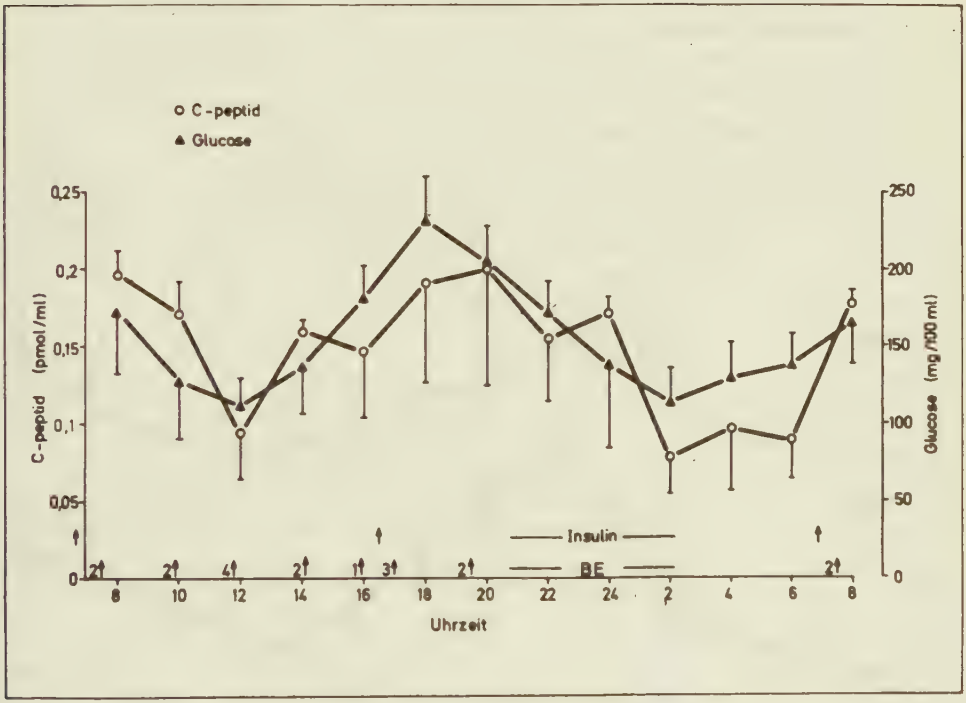


Abbildung 7

24^{h}-Profile der Serumglucose der acht Diabetiker mit C-Peptid und der zwölf Diabetiker ohne C-Peptid

● Diabetiker mit C-Peptid
o Diabetiker ohne C-Peptid
Mittelwerte ± S.E.M.
••• = $p < 0{,}001$
•• = $p < 0{,}01$
• = $p < 0{,}05$

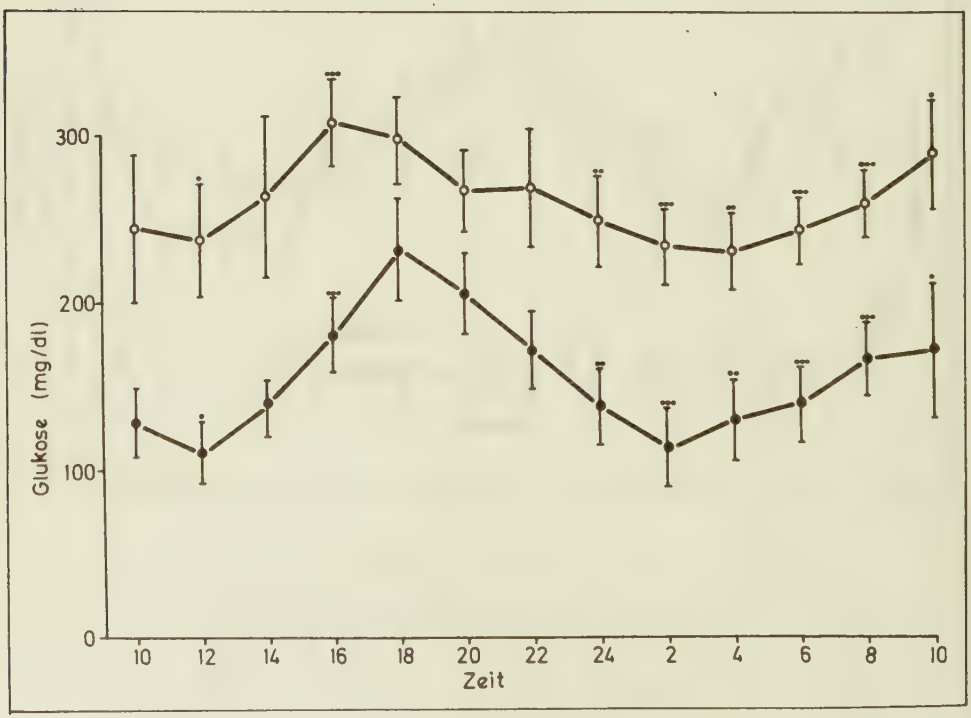
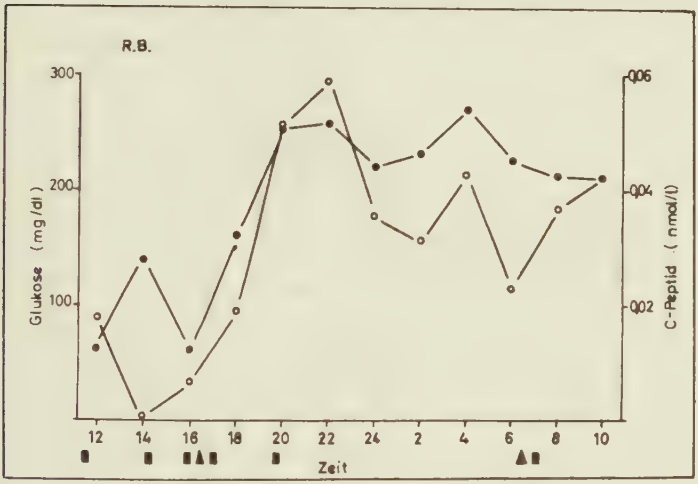


Abbildung 8.1 und 8.2

24^{h}-Profile der Serumglucose und des C-Peptides von zwei Diabetikern mit einer residualen B-Zellfunktion

● Glucose; o C-Peptid; ▮ Mahlzeiten; ▲ Insulingaben



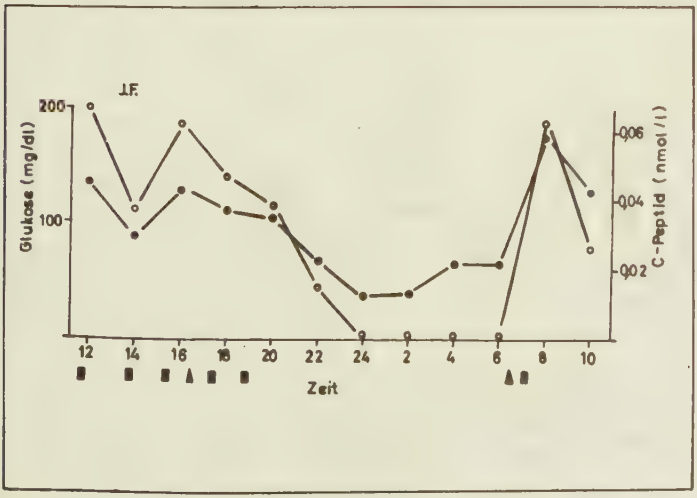
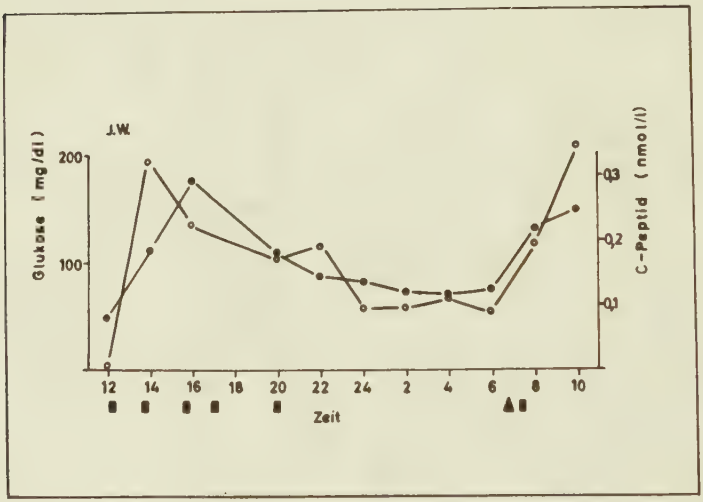


Abbildung 8.3 und 8.4

24^h-Profile der Serumglucose und des C-Peptides von zwei Diabetikern mit einer residualen B-Zellfunktion

● Glucose; o C-Peptid; ■ Mahlzeiten; ▲ Insulingaben



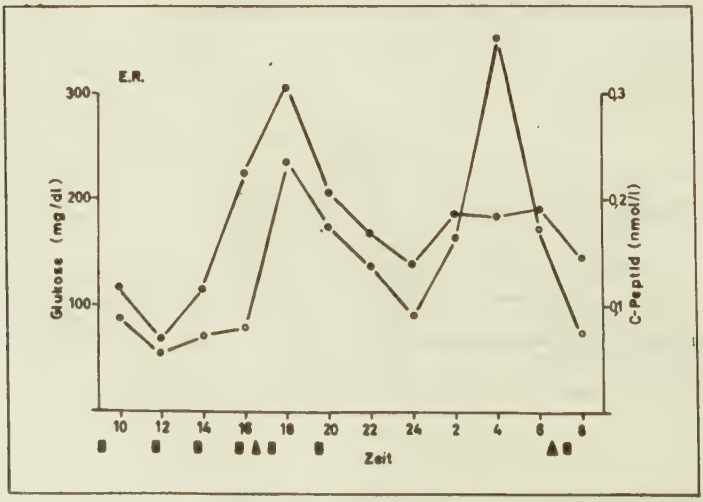
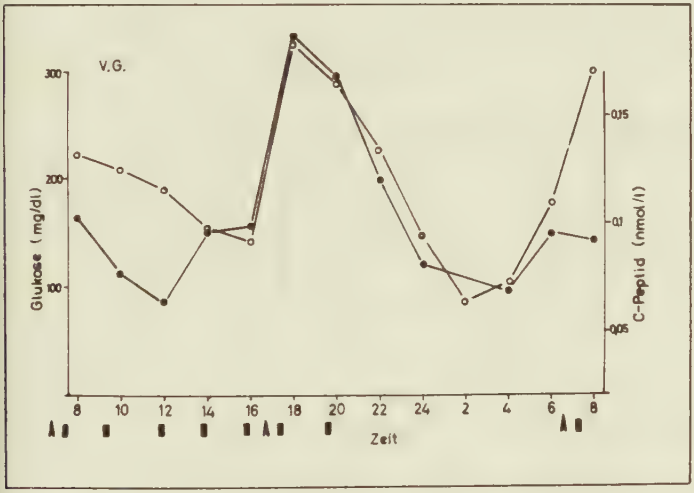


Abbildung 8.5 und 8.6

24^{h}-Profile der Serumglucose und des C-Peptides von zwei Diabetikern mit einer residualen B-Zellfunktion

● Glucose; o C-Peptid; ▮ Mahlzeiten ; ▲ Insulingaben



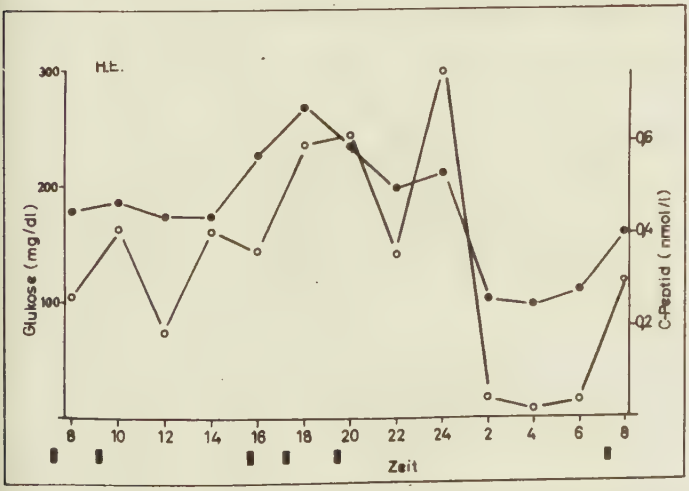
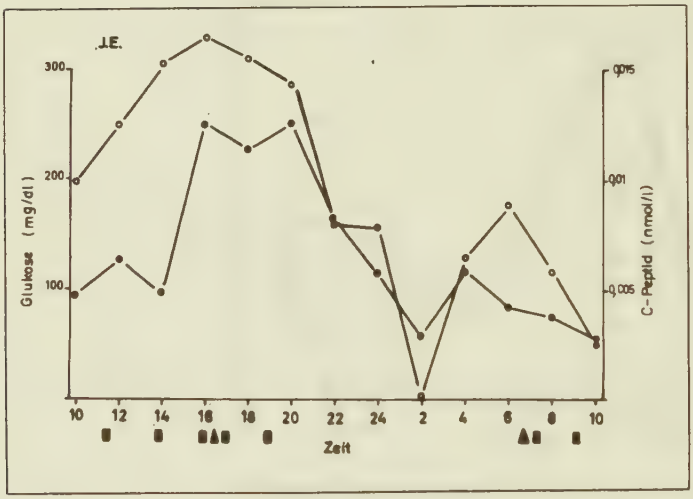
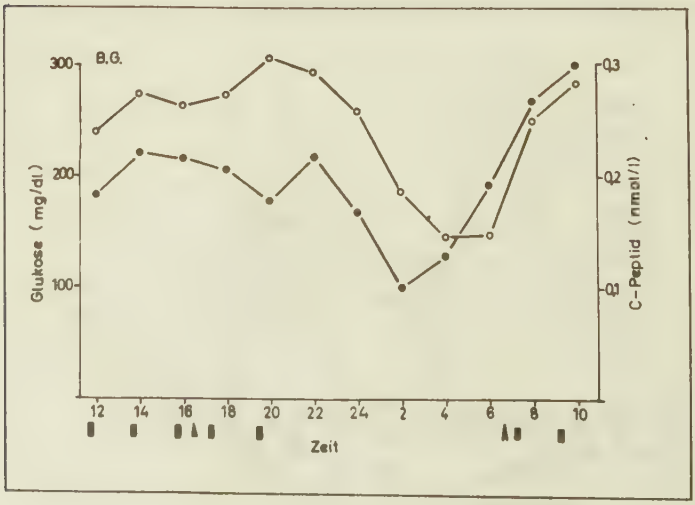


Abbildung 8.7 und 8.8

24^{h}-Profile der Serumglucose und des C-Peptides von zwei Diabetikern mit einer residualen B-Zellfunktion

● Glucose; o C-Peptid; ■ Mahlzeiten; ▲ Insulingaben





3. Ergebnisse aus der Bestimmung des freien und des antikörpergebundenen Insulins

Alle 20 Diabetiker des juvenilen Typ hatten meßbares freies Insulin (s. Tab. 7). Die Durchschnittswerte der einzelnen Diabetiker über die 24^h-Abnahmeperiode lagen in einem Bereich zwischen 1 und 560 mE/l ($\bar{x}$ = 93; sd = 166 mE/l). Während 17 der 20 Diabetiker durchschnittliche freie Insulinwerte in einem Bereich zwischen 1 und 57 mE/l hatten, zeigten die Diabetiker O.F., R.H. und C.B. mit 560, 517 und 317 mE/l wesentlich höhere Konzentrationen an freiem Insulin.

19 der 20 Diabetiker hatten Antikörper gegen das s.c. injizierte Insulin entwickelt. Beim Patienten B.G. war eine signifikante Antikörperbildung noch nicht eingetreten, wie aus den identischen Werten für freies und Gesamt-Insulin zu ersehen ist. B.G. erhielt zum Abnahmezeitpunkt dieser Studie erst seit sechs Tagen Insulin verabreicht.

Das mittlere gebundene Insulin der 19 Diabetiker lag zwischen 20 und 2000 mE/l ($\bar{x}$ = 446; sd = 579 mE/l). Wie aus diesen Zahlen und aus Tabelle 8 ersichtlich, war der Spiegel des gebundenen Insulins von Patient zu Patient sehr unterschiedlich hoch. Innerhalb der 24^h-Abnahmeperiode traten bei den einzelnen Diabetikern erhebliche Konzentrationsschwankungen des gebundenen Insulins auf (s. Tab. 8 und Abb. 11.1-11.20). Das Verhältnis des durchschnittlichen gebundenen zum durchschnittlichen freien Insulin variierte beim jeweiligen Patienten sehr stark und reichte von 0,7 bei der Diabetikerin R.H. bis zu 58,6 bei B.L. (s. Tab. 8 - Verhältnis g/f). Innerhalb der 24^h-Periode schwankte das Verhältnis zwischen freiem und gebundenem Insulin ebenfalls, woraus zu schließen ist, daß es sich beim Äquilibrium zwischen dem an Insulinantikörper gebundenen Insulin und dem frei im Serum vorliegenden Insulin, um ein Fließgleichgewicht handelt.

Die Abbildung 9 veranschaulicht unter anderem die Tagesverläufe des freien und des gebundenen Insulins von 16 der 20 insulinbe-

handelten Diabetiker, sowie des Verhältnisses von gebundenem zu freiem Insulin über den Tag (g/f). In den abgebildeten Summenkurven sind die Werte der drei Diabetiker mit den hohen Serumkonzentrationen an freiem Insulin und des Patienten ohne signifikanten Antikörpertiter gegen Insulin nicht enthalten.
Soweit die Ergebnisse aus der Bestimmung des freien Insulins betroffen sind, werden in der weiteren Darstellung die Werte alle 20 Diabetiker Eingang finden. Die Ergebnisse aus der Bestimmung des gebundenen Insulins werden anhand der Werte der 19 Diabetiker mit insulinbindenden Antikörpern dargestellt. Ein gesonderter Abschnitt wird jedoch der alleinigen statistischen Auswertung der Befunde der 16 Diabetiker mit niedrigem freien Insulin und insulinbindenden Antikörpern gewidmet sein (s. Abb. 9). Sowohl die drei Diabetiker O.F., R.H. und C.B. mit einer peripheren Insulinresistenz als auch der Patient B.G., der über keinen signifikanten Antikörpertiter verfügt, können als Sonderfälle innerhalb des Kollektivs der 20 Diabetiker angesehen werden, zumindest was ihr Seruminsulin betrifft. Aus diesem Grund ist die Auswertung der Insulinfraktionen des, um diese vier Diabetiker verminderten Kollektivs, von besonderem Interesse.

Die Abhängigkeit des Verlaufes des freien und gebundenen Insulins von der verabreichten Insulindosis

Zwischen der Insulindosis, die die 20 Diabetiker zur Abnahmezeit dieser Studie erhielten ($\bar{x}$ = 0,69; sd = 0,26 E / kg /24h - Einzelwerte s. Tab. 1) und den durchschnittlichen freien, gebundenen und Gesamt-Insulinwerten bestand keine signifikante Korrelation. Die Korrelationen sind mit r = 0,0451, r = 0,1753 und r = 0,2096 weit vom Signifikanzniveau $p < 0,05$ (r = 0,4438) entfernt. Aus Abbildung 10 ist zu ersehen, wie unterschiedlich die Gesamt-Insulinwerte einzelner Patienten, bei fast übereinstimmender Höhe der verabreichten Insulindosis, sind. Bei Betrachtung dieser Ergebnisse scheint es, daß die Serumspiegel der einzelnen Insulinfraktionen unabhängig von der applizierten Insulindosis sind.

Eine Abhängigkeit des Tagesverlaufes des freien Insulins vom Zeitpunkt der subkutanen Insulingabe ist jedoch aus dem 24^h-Profil des freien Insulins von 16 Diabetikern zu erkennen (s. Abb. 9). Die Abbildung zeigt einen relativ gleichmäßigen Verlauf des freien Insulins während des Tages mit einem kleinen Gipfel nach der abendlichen Insulininjektion. Am Morgen des 2. Tages der Abnahmeperiode ist ein signifikanter, etwa 1,5 facher Anstieg des freien Insulins zu beobachten. Der Anstieg erfolgte nach der morgendlichen Insulinapplikation.
Eine Auswirkung der Insulingaben auf das freie Insulin war anhand der 24^h-Profile der Mehrzahl der 20 Diabetiker ebenfalls ersichtlich (s. Abb. 11.1-11.20). Bei 14 Patienten war nach der morgendlichen Insulinspritze ein Anstieg des freien Insulins zu verzeichnen. Was das freie Insulin der Diabetikerin O.F. betraf, so lagen ihre Insulinwerte zeitweise außerhalb des Meßbereiches des RIA's für Insulin, sodaß eine Beurteilung nicht möglich war. Bei den restlichen fünf Patienten (C.B., E.M., W.D., H.E. und J.E.) schien eine Abhängigkeit des Tagesverlaufes des freien Insulins von der Insulingabe nicht gegeben zu sein (s. Abb. 11.13-11.18). Lediglich im Falle des Diabetikers H.E. wäre denkbar, daß noch eigensezerniertes Insulin den Verlauf des freien Insulins mitprägte und dadurch Konzentrationsänderungen des freien Insulins kaschierte, die eventuell durch die Insulininjektionen hervorgerufen wurden. Bei den übrigen vier Diabetikern ließ sich kein Grund für ihre diesbezügliche Ausnahmestellung herleiten.
Um herauszufinden mit welcher Latenz sich ein Maximum des freien Insulins nach der morgendlichen Insulingabe beobachten läßt, wurden die 24^h-Profile von sieben der oben genannten 14 Diabetiker untersucht. Die Zeit zwischen der morgendlichen Insulininjektion und dem darauffolgenden Maximum des freien Insulins reichte bei dieser Gruppe von 3 bis 9 Stunden und lag bei den meisten Diabetikern bei 5 Stunden. Die Latenzzeiten der einzelnen Patienten sind zusammen mit der jeweils applizierten Insulindosis und -art in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7

Latenzzeit bis zum Auftreten des Maximums des freien Insulins nach subkutaner Injektion von Insulin

Initialen	Latenzzeit/h	Insulindosis	Insulinart
B. L.	5	16/ 4 E/d	D-H-CR
A. J.	3	40/20 E/d	Ini-/Semitard Leo
E. B.	5	40/12 E/d	D-H-CR
L. S.	5	44/20 E/d	D-H-CR
M. S.	3 - 6	34/28 E/d	D-H-CR
E. R.	8 - 9	38/10 E/d	Komb/D-H-CR
V. G.	5	36/10 E/d	D-H 03 S

D-H = Depot Hoechst

Diabeteseinstellung und Seruminsulinkonzentrationen

Die Mittelwerte des freien, gebundenen und Gesamt-Insulins der 20 Diabetiker korrelierten nicht signifikant mit den vier Parametern der Glucoseeinstellung, MBG, MAGE, M-value und Labilityindex. Zwischen den 24^{h}-Profilen des freien Insulins und der Serumglucose wurde jedoch bei vier Diabetikern eine signifikante positive Korrelation gefunden: H.E. $r = 0{,}758$, $p < 0{,}01$; J.E. $r = 0{,}727$, $p < 0{,}01$; P.P. $r = 0{,}578$, $p < 0{,}05$; O.F. $r = 0{,}707$, $p < 0{,}05$.

Bei der Patientin R.B. wurde zwischen den beiden Parametern eine signifikante negative Korrelation beobachtet: $r = -0{,}587$, $p < 0{,}05$. Nichtdiabetiker weisen in der Regel eine signifikante positive Korrelation zwischen Insulin- und Glucoseprofilen auf, d.h. ihre Insulinsekretion wird weitgehend vom Verhalten der Blutglucose bestimmt. Resultiert nun aus dem, bei den vier Patienten fast gleichsinnigen Verlauf der Serumglucose und des freien Insulins eine besonders gute, dem Normalen angenähertere Glucoseeinstellung? Die Befunde sprechen dagegen. Zwar waren die Diabetiker

H.E. und J.E. entsprechend ihrer noch vorhandenen B-Zellrestfunktion eher gut eingestellt, aber die Diabeteseinstellung der Patienten O.F. und P.P. kann lediglich als ungenügend charakterisiert werden (s. Tab. 3 u. 4). Auch bei einer intensivierten Therapie mit drei Insulingaben täglich, konnte beim Diabetiker P.P. keine befriedigende Diabeteskontrolle erzielt werden.

C-Peptid und Seruminsulin

Weder das mittlere freie, gebundene noch das Gesamt-Insulin korrelierten signifikant mit der mittleren CPI-Konzentration. Für das freie Insulin war der Korrelationskoeffizient $r = -0{,}6282$, für das gebundene Insulin $r = 0{,}063$ und für das Gesamt-Insulin $r = 0{,}4983$. Alle drei Korrelationskoeffizienten lagen damit unterhalb des Signifikanzniveaus von $p < 0{,}05$, das bei $n = 8$ einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0{,}7067$ hat.
Die Patienten mit ($n = 8$) und ohne B-Zellrestfunktion ($n = 12$) unterschieden sich in der Höhe des durchschnittlichen freien, gebundenen und Gesamt-Insulins nicht signifikant.
Bei den einzelnen Patienten war allein bei der Diabetikerin I.F. eine signifikante positive Korrelation zwischen den 24^{h}-Profilen des C-Peptides und des freien Insulins gegeben ($p < 0{,}05$).

Im Falle des Patienten H.E. war der Korrelationskoeffizient beider Kurven mit $r = 0{,}5345$ knapp unterhalb des vorgegebenen Signifikanzniveaus von $p < 0{,}05$ ($r = 0{,}5529$). Signifikante positive Korrelationen zwischen freiem Insulin und Serumglucose, sowie zwischen Serumglucose und C-Peptid, lassen jedoch bei diesem Diabetiker eine signifikante lineare Beziehung zwischen dem freien Insulin und C-Peptid in vivo plausibel erscheinen.
Eine ins Gewicht fallende Beteiligung des C-Peptides, d.h. des endogen sezernierten Insulins am freien Insulin, ist bei der Diabetikerin I.F. unwahrscheinlich. Mit einer CPI von 0,03 pmol/ml im Tagesdurchschnitt, verfügte sie über eine minimale B-Zellfunktion, die die beobachtete Korrelation zwischen ihrem C-Peptid und dem freien Insulin nicht bedingen konnte.

Ein signifikanter Anteil des autologen am freien Insulin ist beim Patienten H.E., der mit 0,33 pmol/ml eine erhebliche residuale B-Zellfunktion aufwies, auch nur dann anzunehmen, wenn vorausgesetzt wird, daß der überwiegende Teil des sezernierten Insulins nicht an zirkulierende insulinbindende Antikörper gebunden wird. Eine Korrelation zwischen dem freien Insulin und dem C-Peptid scheint mit einer besonders vorteilhaften Diabeteskontrolle einherzugehen. So sind die Patienten I.F. und H.E. die einzigen aus dem Kollektiv der 20 Diabetiker, deren MAGE niedriger als 100 mg/dl ist und die damit nach den Kriterien von Service et al. (54), als stabile Diabetiker zu bezeichnen wären. Darüberhinaus zeichnete sich H.E. durch den niedrigsten M-value, und I.F. durch die niedrigste mittlere Glucosekonzentration (MBG) des Kollektivs aus.

Alleinige statistische Auswertung der Befunde der 16 Diabetiker mit niedrigem freien Insulin und insulinbindenden Antikörpern (Gruppe der 20 Diabetiker ohne B.G., O.F., R.H. und B.G.).

Die Gründe, die für eine gesonderte statistische Auswertung dieses Kollektivs sprechen, wurden oben (s. S.56) dargelegt. Bezüglich der Mittelwerte des freien, gebundenen und Gesamt-Insulins und deren Korrelation und Auswertung in Hinblick auf die Diabeteseinstellung und das C-Peptid, ergaben sich mit einer Ausnahme Befunde, die mit den bisher dargestellten vergleichbar waren. Die Ausnahme betraf das durchschnittliche freie Insulin der 16 Diabetiker. Diabetiker mit C-Peptid verfügten über ein signifikant ($p < 0{,}01$) höheres freies Insulin als die Diabetiker ohne C-Peptid. Diabetiker mit einer residualen B-Zellfunktion ($n = 7$) wiesen ein durchschnittliches freies Insulin von $38{,}5 \pm 2{,}5$ mE/l auf, diejenigen ohne diese Funktion ($n = 9$) hatten im Mittel ein freies Insulin in Höhe von $17{,}8 \pm 1$ mE/l.
Abbildung 12 veranschaulicht dieses Verhältnis. Die Differenz zwischen den beiden 24^h-Profilen des freien Insulins war zu jeder Abnahmezeit statistisch signifikant. Interessanterweise zeigte die Gruppe mit hohem freien Insulin, einen im Vergleich zur anderen Gruppe niedrigeren Glucosespiegel (s. Abb. 12).

Tabelle 8

Serumkonzentrationen des freien, antikörpergebundenen und Gesamt-Insulins der 20 Diabetiker vom juvenilen Typ

Initialen	freies Insulin (mE/l) MW.	freies Insulin (mE/l) B.	geb. Insulin (mE/l) MW.	geb. Insulin (mE/l) B.	Gesamt-Insulin (mE/l) MW.	g/f
O. F.	560	347 - 640	2000	2000	2560	3,6
R. H.	517	241 - 640	379	0 - 827	896	0,7
C. B.	317	273 - 337	633	100 - 880	950	2,0
B. L.	20	8 - 37	1173	267 -1920	1193	58,6
P. P.	30	13 - 45	168	71 - 229	198	5,6
A. J.	13	2 - 24	62	30 - 98	75	4,8
E. B.	9	6 - 14	119	58 - 200	128	13,0
E. M.	18	12 - 29	154	114 - 253	172	8,6
L. S.	19	7 - 39	39	0 - 77	58	2,1
W. D.	35	27 - 39	368	199 - 645	403	10,5
M. G.	1	0 - 3	20	0 - 48	21	20,0
M. S.	23	15 - 27	136	38 - 233	159	6,0
R. B.	37	19 - 68	1700	1194 -1920	1737	46,0
I. F.	48	30 - 97	355	34 - 639	403	7,4
J. W.	29	10 - 57	22	5 - 45	51	0,8
E. R.	21	8 - 51	768	24 -1920	789	36,6
V. G.	53	25 - 98	68	27 - 119	121	1,3
H. E.	30	2 - 60	81	46 - 144	111	2,7
J. E.	57	45 - 77	232	125 - 415	289	4,0
B. G.	30	12 - 57	-	- - -	30	-
MW.	93		446		539	
B.	1 - 560		20 - 2000		21 - 2560	

g/f = antikörpergebundenes / freies Insulin
MW. = Mittelwert
B. = Bereich

Abbildung 9

24^{h}-Profile von 16 insulinbehandelten Diabetikern mit relativ niedrigen Serumkonzentrationen an freiem Insulin und signifikanten Antikörpertitern (Gruppe der 20 insulinbehandelten Diabetiker ohne die Patienten O.F., R.H., C.B. und B.G.)

Mittelwerte ± S.E.M.. Die Zeit der Insulininjektionen ist durch Pfeile angezeigt; g/f = Verhältnis gebundenes zu freies Insulin

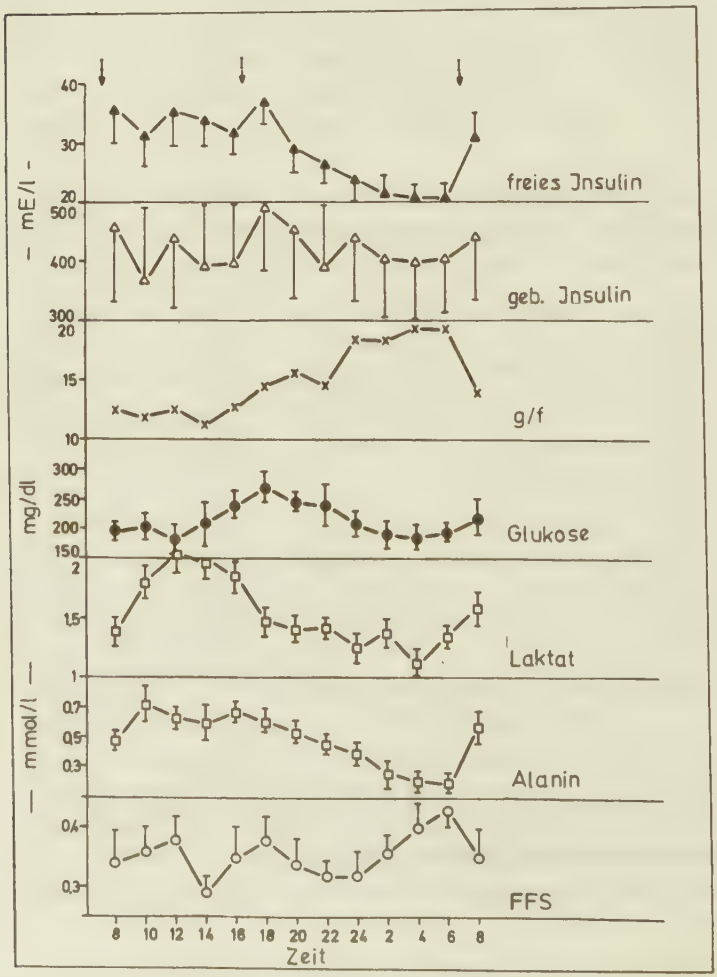


Abbildung 10

Die Beziehung zwischen Gesamt-Insulin und Insulindosis in E / kg / 24h der 20 insulinbehandelten Diabetiker

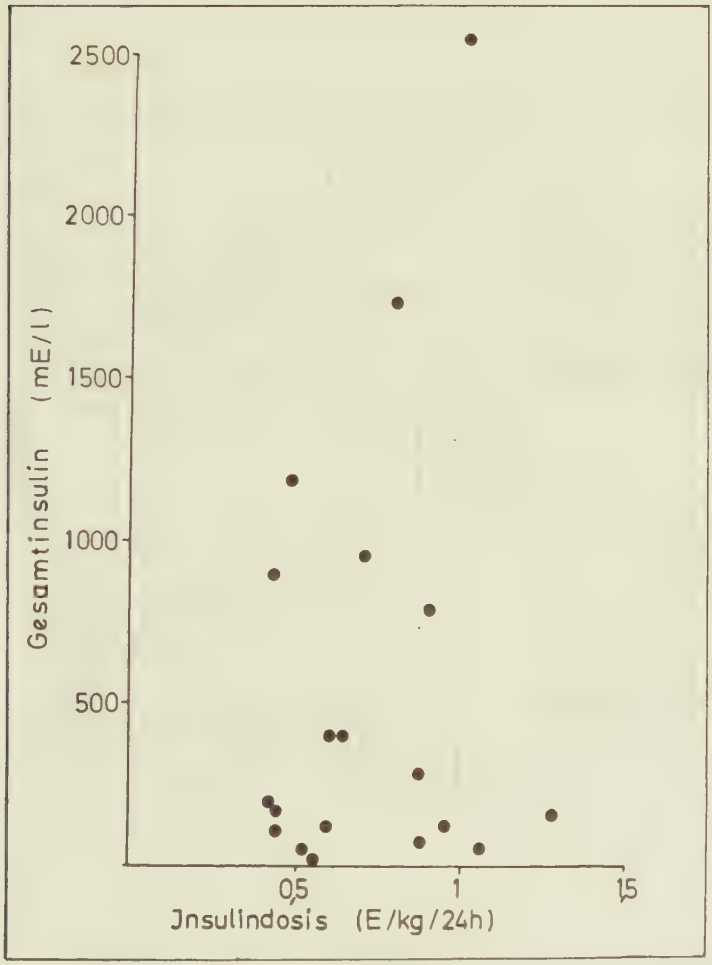


Abbildung 11.1, 11.2, 11.3 und 11.4

24^h-Profile des freien und des antikörpergebundenen Insulins der Patienten B.L., A.J., E.B. und L.S.

Δ = freies Insulin; ▲ = geb. Insulin

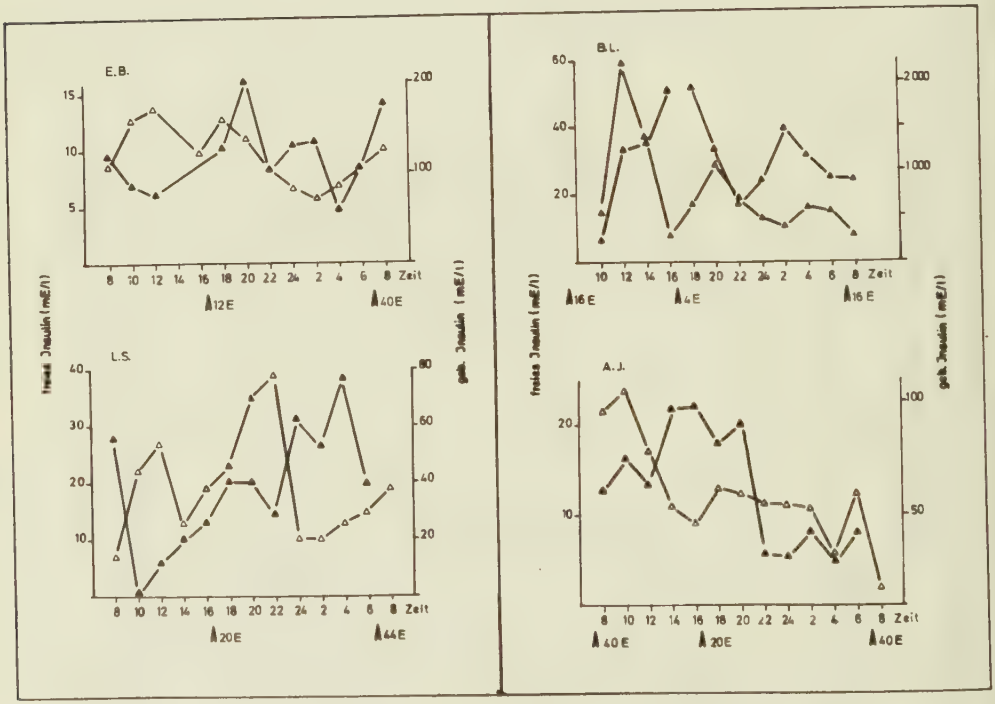


Abbildung 11.5, 11.6, 11.7 und 11.8

24^h-Profile des freien und des antikörpergebundenen Insulins der Patienten E.R., M.S., V.G. und M.G.

Δ = freies Insulin; ▲ = geb. Insulin

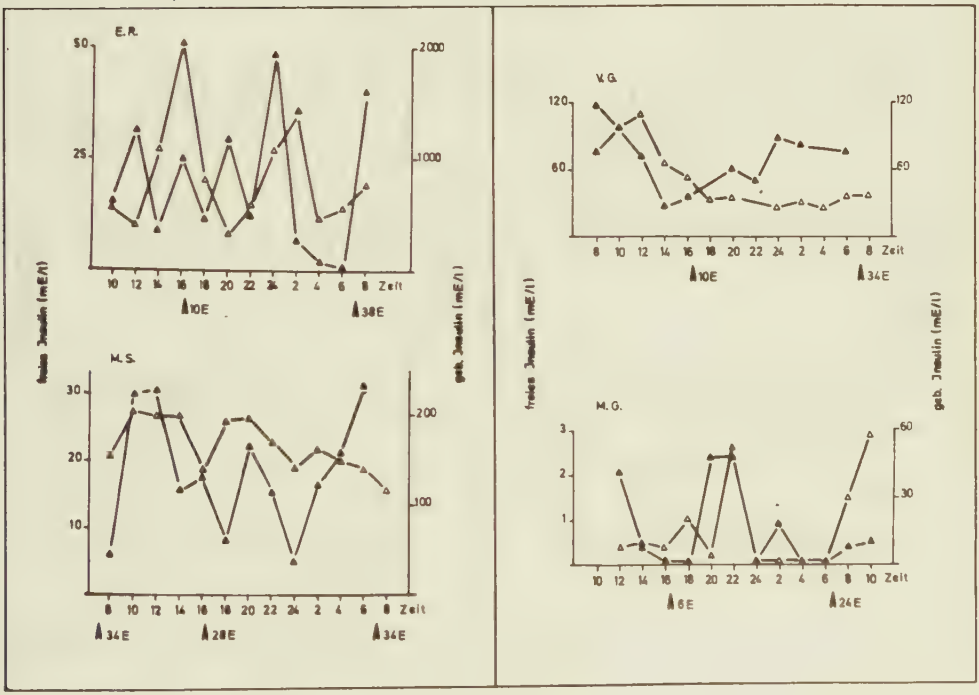


Abbildung 11.9, 11.10, 11.11 und 11.12

24^h-Profile des freien und des antikörpergebundenen Insulins der Patienten R.B., I.F., J.W. und P.P.

Δ = freies Insulin; ▲ = geb. Insulin

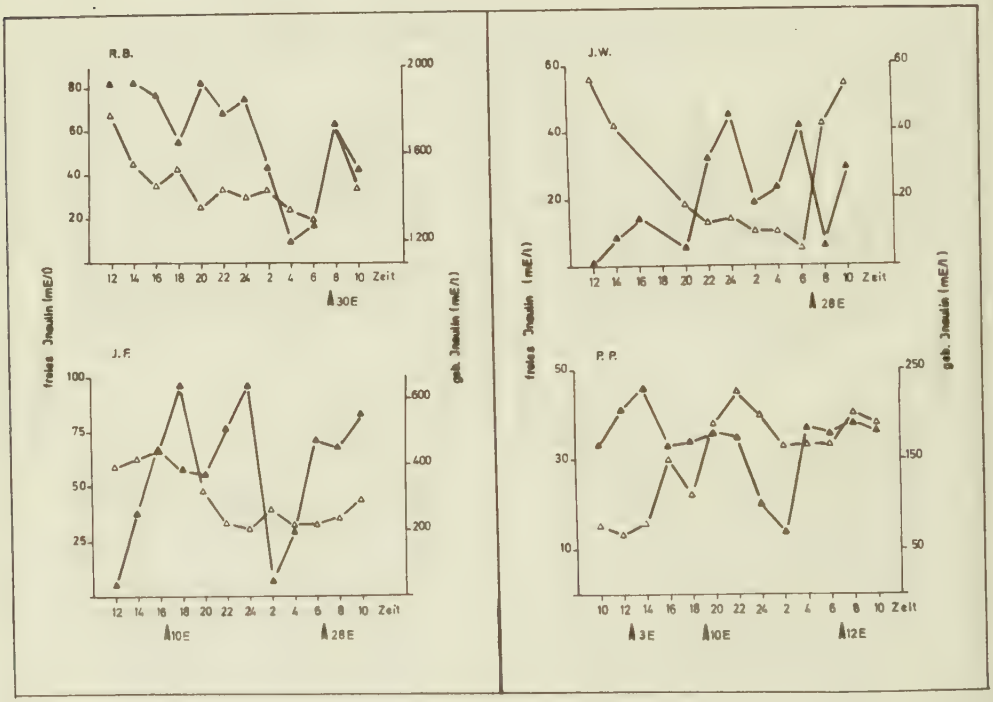


Abbildung 11.13, 11.14, 11.15 und 11.16

24^h-Profile des freien und des antikörpergebundenen Insulins der Patienten E.M., W.D., H.E. und J.E.

Δ = freies Insulin; ▲ = geb. Insulin

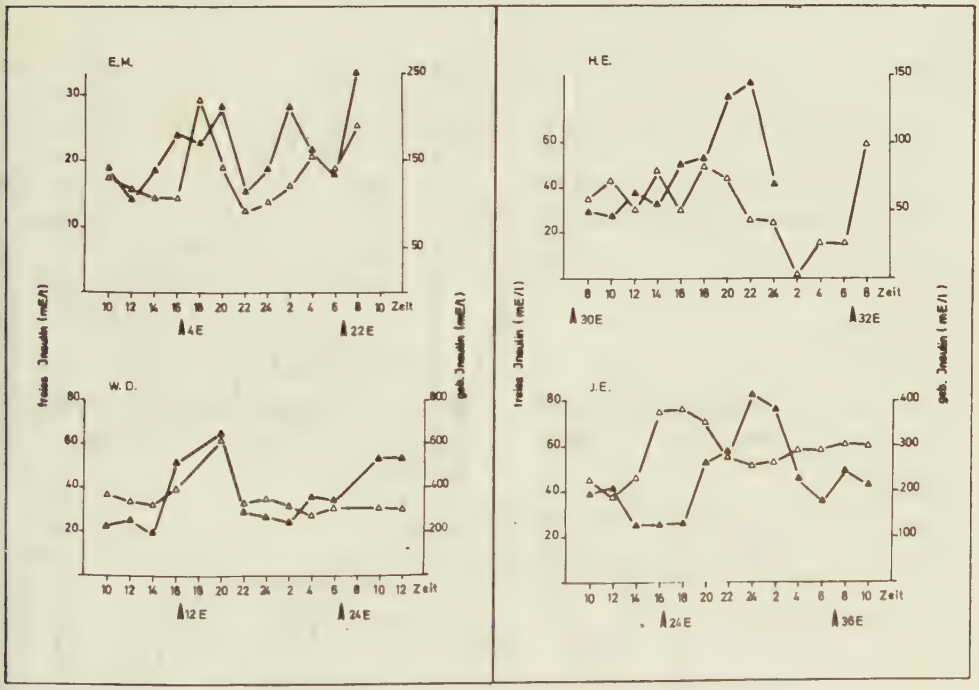


Abbildung 11.17, 11.18, 11.19 und 11.20

24^h-Profile des freien und des antikörpergebundenen Insulins der Patienten O.F., C.B., R.H. und B.G.

Δ = freies Insulin; ▲ = geb. Insulin

Der Patient B.G. verfügte zum Zeitpunkt der Blutabnahmen über keine signifikante Antikörperbildung gegen Insulin.

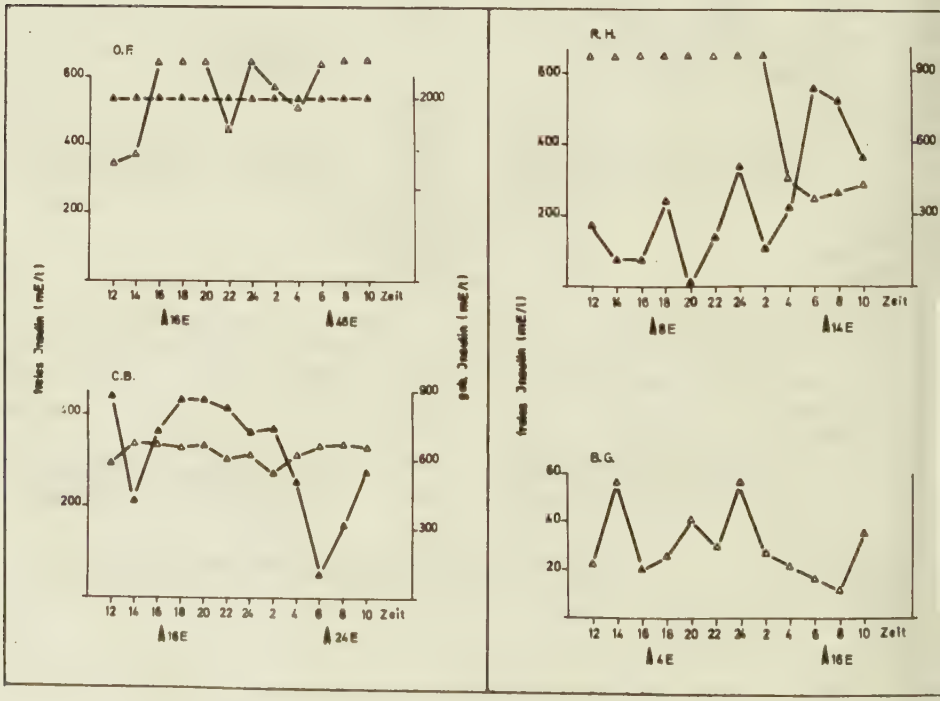
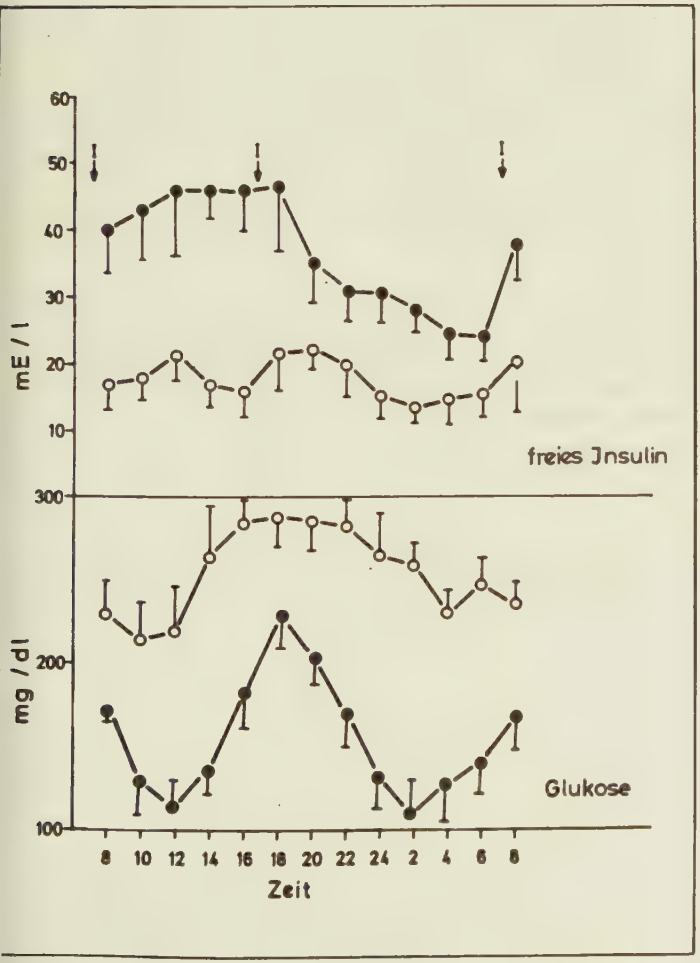


Abbildung 12

24^h-Profile von freiem Insulin und Serumglucose der Patienten mit und ohne C-Peptid (n = 16; Gruppe der 20 insulinbehandelten Diabetiker ohne die Patienten O.F., R.H., C.B. und B.G.)

Mittelwerte ± S.E.M.
• Diabetiker mit C-Peptid
o Diabetiker ohne C-Peptid



4. Charakterisierung der insulinbindenden Antikörper

19 der 20 insulinbehandelten Diabetiker hatten insulinbindende Antikörper entwickelt. Hierfür spricht die im Serum dieser Patienten vorgefundene Differenz zwischen den Konzentrationen des Gesamt-Insulins und des freien Insulins (s. Tab. 8). Nur bei 13 dieser 19 Patienten war es möglich, die Bindungseigenschaften der Antikörper mittels einer Sättigungsanalyse und eines Scatchard-plots zu studieren. Keine typischen Scatchard-plots (63) konnten bei der Antikörpercharakterisierung von sechs Patientenseren erhalten werden. Entweder waren die Serumspiegel der insulinbindenden Antikörper zu niedrig (im Falle der Patienten V.G., H.E. und J.E.), oder es zeigte sich beim Scatchard-plot der sogenannte "hook-Effekt". Der "hook-Effekt" wurde außer bei der Charakterisierung der Antikörper des Patienten E.R. beim Scatchard-plot zweier Patientenseren mit hohen Konzentrationen an freiem Insulin vorgefunden (Seren der Diabetikerinnen R.H. und C.B.). Die Assoziationskonstanten (K_1 und K_2) und die Bindungskapazitäten (Ab_1 und Ab_2) der Insulinantikörper von 13 Patienten sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Zwischen den Parametern der Antikörpercharakterisierung und der Dauer der Insulinbehandlung, der Insulindosis, sowie den Parametern der Diabeteseinstellung MAGE, MBG, M-value und Labilityindex bestanden keine signifikanten Korrelationen.

Tabelle 9

Bindungskapazität und Assoziationskonstanten insulinbindender Antikörper von 13 Diabetikern

Initialen	Bindungskapazität		Assoziationskonstante	
	Ab_1 nmol/l	Ab_2 umol/l	K_1 l/umol	K_2 l/umol
O. F.	1,34	0,019	220	2,1
B. L.	6	0,18	190	1,27
P. P.	0,36	0,15	840	0,18
A. J.	28	3	3,1	0,04
E. B.	0,27	0,002	45	4,8
E. M.	2	0,17	27,5	0,06
L. S.	1,33	0,63	37,4	0,047
W. D.	3	1,35	26	0,1
M. G.	1,33	0,035	45	0,58
M. S.	0,67	0,067	268	1,05
R. B.	73	0,21	27	2,9
I. F.	13,4	1,1	29	0,1
J. W.	0,13	0,008	200	1,9

5. Ergebnisse aus der Bestimmung des Laktat, Alanin und der freien Fettsäuren (FFS)

Die mittlere Laktatkonzentration im Serum von 16 Diabetikern (Kollektiv der 20 insulinbehandelten Diabetiker ohne die Patienten O.F., R.H., C.B. und B.G.) war 1,54 ± 0,08 mmol/l. Der Mittelwert wurde aus den Einzelwerten des 24^h-Profils (s. Abb. 9) berechnet. Der zirkadiane Verlauf des Laktats zeigte einen Anstieg am frühen Morgen mit einem Maximum um 12.00 Uhr und einem Abfall während der Nacht (Abb. 9). Nach einem Plateau zwischen 10.00 und 16.00 Uhr wies die Summenkurve des Alanin der 16 Patienten einen ähnlichen nächtlichen Abfall auf (Abb. 9). Die mittlere Alaninkonzentration während des 24^h-Zeitraumes belief sich auf 0,51 ± 0,08 mmol/l.

Die Serumkonzentration der FFS variierte im Laufe des Tages und stieg im Gegensatz zu den Werten des Laktat und Alanin während der nächtlichen Abnahmezeit in geringem, dennoch signifikanten Ausmaß an. Dieser Anstieg war von einem scharfen Konzentrationsabfall am nächsten Morgen gefolgt (s. Abb. 9). Die mittlere Serumkonzentration der FFS der 16 Diabetiker war 0,35 ± 0,01 mmol/l.

Wie bereits aus den Verläufen des Laktat und Alanin der Abbildung 9 ersichtlich, korrelierten die Summenkurven beider Parameter positiv mit dem Serumspiegel des freien Insulins der 16 Diabetiker (s. Tab. 12). Mit dem in Abbildung 9 dargestellten Verhältnis von antikörpergebundenem zu freiem Insulin (g/f) korrelierten die Serumspiegel der beiden Metabolite negativ (s. Tab. 11). Dagegen wurde eine positive Korrelation zwischen dem g/f Profil und dem 24^h-Profil der FFS vorgefunden (s. Abb. 9 und Tab. 11).

Tabelle 10

Serumkonzentrationen des Laktats, Alanins und der freien Fettsäuren der 20 insulinbehandelten Diabetiker (Mittelwerte aus den Meßwerten der 24^{h}-Abnahmeperiode)

Initialen	Laktat mmol/l	Alanin mmol/l	FFS mmol/l
O. F.	1,74	0,48	0,35
R. H.	2,27	0,70	0,28
C. B.	1,84	0,47	0,48
B. L.	1,57	0,72	0,21
P. P.	1,95	0,51	0,35
A. J.	1,67	0,64	0,36
E. B.	1,26	0,49	0,36
E. M.	1,54	0,65	0,37
L. S.	1,76	0,70	0,19
W. D.	3,13	0,55	0,42
M. G.	1,29	0,57	0,61
M. S.	1,43	0,49	0,32
R. B.	1,30	0,56	0,38
I. F.	1,85	0,62	0,50
J. W.	1,28	0,42	0,28
E. R.	-	-	0,33
V. G.	-	-	0,32
H. E.	-	-	0,40
J. E.	1,27	0,58	0,14
B. G.	1,58	0,84	0,24

Tabelle 11

Korrelationen zwischen den Insulinfraktionen (freies Insulin und Verhältnis - g/f - gebundenes zu freiem Insulin) und den Metaboliten; Laktat, Alanin und freie Fettsäuren

Variable 1	Variable 2	r	p
freies Insulin	Laktat	0,6849	$< 0,01$
freies Insulin	Alanin	0,8592	$< 0,001$
freies Insulin	FFS	n.s.	
Verhältnis g/f	Laktat	-0,7801	$< 0,01$
Verhältnis g/f	Alanin	-0,8855	$< 0,001$
Verhältnis g/f	FFS	0,5896	$< 0,05$

Diskussion

1. Zur Verwendung der Glucose als Parameter der Diabeteseinstellung

Obwohl Insulinmangel außer den Störungen im Kohlenhydratstoffwechsel auch Protein- und Fettstoffwechselstörungen bedingt, stellen Glucosebestimmungen im Blut und Urin weiterhin die Standardmessungen für die Bewertung der diabetischen Stoffwechseleinstellung dar. Sie sind die Grundlage für die therapeutischen Bemühungen des Arztes. Auch in dieser Arbeit wurden die Glucosewerte im Sinne einer Charakterisierung der Diabeteseinstellung verwendet, und vier Parameter ausgewählt, die die Einstellung der untersuchten Diabetiker in Zahlen ausdrücken und untereinander vergleichbar machen (s. Tab. 3). Was spricht für diese Bevorzugung der Glucosemessung und welche Hinweise bestehen, die die Verwendung anderer Metabolite zur Kennzeichnung der Diabeteseinstellung sinnvoll erscheinen lassen?

Ein Therapieziel des Arztes, der versucht insulinabhängige Diabetiker einzustellen, ist einerseits, die diabetischen Komplikationen, wie den hypoglykämischen Schock und das hyperosmolare bzw. ketoazidotische Koma zu vermeiden. Dies ist über eine "Einstellung" der Blutglucosewerte in einen Bereich möglich, der nahe den Normalwerten liegt, da das Entstehen dieser Komplikationen kausal eng mit dem Glucoseverhalten verbunden ist. Die Diagnose und Verlaufskontrolle erfolgen ebenfalls zu einem großen Teil über Glucosemessungen. Andererseits ist langfristig gesehen das Hauptanliegen des Therapeuten die Verhinderung, oder wenigstens Verzögerung des Auftretens der diabetischen Spätschäden, der Mikro- und Makroangiopathie. Wie bereits in der Einleitung erörtert, scheint zumindest bei der Entstehung der Mikroangiopathie, eine schlechte Glucoseeinstellung ursächlich mitbeteiligt zu sein. Solange eine kausale Beziehung des Verhaltens der Blutglucose zum Auftreten der diabetischen Spätschäden wahrscheinlich ist, und nicht das Gegenteil bewiesen wurde, rechtfertigt dies eine Diabeteskontrolle über Glucosebestimmungen.

Einen neuen Aspekt in die Diskussion über die Relevanz der Glucosemessung brachte eine Untersuchung von Alberti et al. (6). In einer Studie, in der der Tagesverlauf einer Reihe von Metaboliten und Hormonen (Laktat, Alanin, Pyruvat, Glycerin, Ketonkörper, Somatotropes Hormon) untersucht und mit Plasmaglucose verglichen wurde, fanden Alberti et al. bei Diabetikern mit peripheren Glucosewerten im Normalbereich, deutlich erhöhte Laktat und Pyruvatwerte(ca. 50 %). STH und der Quotient Alanin/Pyruvat und nicht wie bisher angenommen, die Blutglucose, wurden als die Parameter gefunden, die am ehesten die Indikatoren für die erhöhten Werte anderer Metabolite waren. Normoglykämie, verbunden mit normalen Lipidwerten, scheint somit zu Unrecht als Maß für eine gute Diabeteseinstellung zu gelten. Doch muß eine gute Diabeteseinstellung denn tatsächlich die Normalisierung aller bei der diabetischen Stoffwechselstörung veränderten Metabolite bedeuten? Ist es nicht vielmehr ausreichend zu versuchen, diejenigen Metabolite zu normalisieren, die einen Anteil an der Pathogenese der diabetischen Komplikationen, insbesondere der Spätschäden haben? Die volle Wertigkeit der angeführten Befunde Albertis kann wohl erst dann beurteilt werden, wenn Studien vorliegen, die die Beziehung anderer Metabolite als Glucose, zu den diabetischen Spätschäden untersuchen.

Solange keine Klarheit über die Bedeutung anderer Metabolite für die Diabetestherapie besteht, scheint es sinnvoll, sich bei der Therapie und bei der Charakterisierung der Einstellung an den Glucosewerten zu orientieren.

Die Beurteilung der Diabeteseinstellung anhand von wenigen Glucosewerten bereitet Schwierigkeiten, da insbesondere bei den insulinabhängigen Diabetikern die Glucosewerte im Laufe des Tages beträchtlich schwanken können. Um andererseits Tagesprofile der Glucose, die sich aus zahlreichen Einzelwerten zusammensetzen, hinreichend beurteilen und mit geringem Aufwand vergleichen zu können, ist die Verwendung von Parametern nötig, mit deren Hilfe man diese Profile kennzeichnen kann. Eine Reihe von derartigen Parametern der Glucoseeinstellung wurden eingeführt. Ihre Verwendung

blieb jedoch vornehmlich Forschungszwecken vorbehalten. Für die Kennzeichnung der Glucoseeinstellung der Diabetiker, die in dieser Studie untersucht wurden, verwendeten wir die von Service und Molnar entwickelten Parameter MAGE (54) und Labilityindex (55), sowie den M-value von Schlichtkrull (56) und die mittlere Blutglucosekonzentration (s. Kriterien der Stoffwechseleinstellung - S. 15). Welche Vor- und Nachteile beinhalten nun diese Parameter in Hinblick auf eine Kennzeichnung der Diabeteseinstellung, und wie gut ist - durch die Brille der Parameter betrachtet - die Glucoseeinstellung der 20 Diabetiker?

Wie oben ausführlich dargelegt (s. Kriterien der Stoffwechseleinstellung), ist der MAGE ein Index für das Ausmaß von Glucoseschwankungen. Bei insulinbehandelten Diabetikern scheint der MAGE darüberhinaus ein Maß für die Einstellbarkeit des jeweiligen Diabetikers zu sein.
Auch nach einer Optimierung der subkutanen Insulintherapie durch vier Altinsulininjektionen täglich, konnten Service et al. (54) keine signifikante Reduktion des MAGE und damit der Glucoseschwankungen beobachten. Dagegen wurde mit dieser intensivierten Therapie eine signifikante Verminderung der mittleren Blutglucosekonzentration ($p < 0,04$), des Labilityindex ($p < 0,006$) und des M-value ($p < 0,01$) erreicht - auf Kosten einer signifikanten Zunahme hypoglykämischer Episoden.
Service et al. schlossen hieraus, daß mit der herkömmlichen s.c. Insulintherapie jeder insulinpflichtige Diabetiker nur bis zu einem, ihm durch das Ausmaß seiner Glucoseschwankungen vorgegebenen Maße, eingestellt werden könne. Einschränkend sei hierzu bemerkt, daß die zitierte Studie keinesfalls auszuschließen vermochte, daß nach Monaten oder Jahren der Diabetesdauer, nicht doch eine signifikante Änderung der Amplitude dieser Glucoseschwankungen eintreten würde.
Der Bereich der MAGE-Werte der 20 Patienten dieser Arbeit war mit 62 bis 266 mg/dl ($\bar{x}$ = 171; sd = 58,8 mg/dl) vergleichbar mit dem Bereich (58 bis 229 mg/dl) der neun Diabetiker der

oben zitierten Studie (54). Die Glucoseeinstellung der 20 Diabetiker, die, wie die Abb. 3 verdeutlicht, im Mittel keineswegs als gut anzusehen ist, scheint demnach der üblicherweise bei insulinbehandelten Diabetikern vorzufindenden Diabeteskontrolle zu entsprechen. Als Kriterium für eine stabile Stoffwechseleinstellung postulierte Service einen MAGE von weniger als 100 mg/dl. Diesem genügten zwei Diabetiker vorliegender Studie, I.F. und H.E., mit MAGE-Werten von jeweils 62 und 79 mg/dl. Als Grenzfall zwischen stabilen und unstabilen Diabetikern kann die Patientin J.W. mit einem MAGE von 102 mg/dl betrachtet werden. Stabile Glucoseeinstellung ist ein willkürlich definierter Begriff und geht in diesem Fall keinesfalls mit völliger Normalisierung der Glucoseregulation einher. Stoffwechselgesunde zeigten Glucosewerte um 80 mg/dl und relativ geringe Glucoseschwankungen mit MAGE-Werten bis maximal 60 mg/dl (54). Diesem Ideal kam einzig die Diabetikerin I.F. mit Glucosewerten um 100 mg/dl und einem MAGE von 62 mg/dl nahe. Allerdings hatte sie zu zwei Abnahmezeiten Glucosewerte, die im hypoglykämischen Bereich (50 mg/dl) lagen. Eine isolierte Betrachtung des MAGE erlaubt zwar ein Urteil über das Ausmaß der Glucoseschwankungen und vielleicht über die Einstellbarkeit eines Diabetikers, nicht jedoch über die Höhe des Glucosespiegels, bei dem sich diese Schwankungen abspielen. Als einfachster Parameter bietet sich hierfür der Mittelwert der einzelnen Glucosewerte über den Tag an (MBG). Die MBG-Werte dieses Kollektivs waren mit Konzentrationen zwischen 96 und 333 mg/dl ($\bar{x}$ = 216; sd = 74,7 mg/dl) sehr unterschiedlich hoch (s. auch Tab. 3).

Der MBG-Wert hat als Parameter der Glucoseeinstellung den Nachteil, daß zu niedrige Glucosewerte ($<$ 50 mg/dl) positiv in ihn eingehen. Dagegen zeigt der M-value den Vorzug, daß nicht nur hohe, sondern auch niedrige Glucosewerte negativ bewertet werden (mathem. Formel des M-value s. Kriterien der Stoffwechseleinstellung S. 16). Als ungünstig erweist sich bei Verwendung des M-value die negative Bewertung niedriger Glucosewerte, die als normal zu betrachten sind. Durch die mathematische Formel, die

diesem Parameter zugrundeliegt, wird z.B. ein absolut normaler Glucosewert von 80 mg/dl ebenso bewertet wie 185 mg/dl. Die Abhängigkeit der Höhe des M-value von der Zahl der Glucoseschwankungen und damit indirekt vom Abnahmemodus, schränkt seine Vergleichbarkeit ein. Allein solche M-values können verglichen werden, die auf dem gleichen Abnahmemodus beruhen.

Während MBG, MAGE, M-value die Glucoseeinstellung der Diabetiker während der 24 stündigen Abnahmeperiode kennzeichnen, gibt der Labilityindex, so wie er hier verwendet wurde, ein Maß der Stoffwechseleinstellung über einen längeren Zeitraum (s. S. 17). Ein Nachteil dieses Index liegt in der fraglichen Exaktheit, der in der Klinik bestimmten Uringlucosewerte. Die Genauigkeit hängt von der Motivation der Patienten zur Zusammenarbeit mit dem Klinikpersonal ab. Weiterhin wird die Glucosemenge, die in den Harn zur Ausscheidung kommt, von der individuellen Höhe der Nierenschwelle für Glucose beeinflußt. Diese schwankt bei jungen nierengesunden Menschen um einen Normbereich von 160 mg/dl. In seltenen Fällen ist die Nierenschwelle für Glucose erniedrigt, was bei den betroffenen Personen zur Glucosurie auch bei normoglykämischen Werten führt. Umgekehrt steigt mit zunehmendem Alter, wahrscheinlich in Abhängigkeit vom Zustand des Gefäßsystems, die Nierenschwelle für Glucose an (80/81). Eine Erhöhung der Nierenschwelle wird auch bei Niereninsuffizienz beobachtet. Aufgrund dieser Varianten der Nierenschwelle für Glucose wurde bei den Patienten B.L. und R.H., die niereninsuffizient waren, von einer Ermittlung des Labilityindex abgesehen.

Welche der vier Variablen die Glucoseeinstellung am besten charakterisiert, vermag ich nicht zu sagen. Jeder der beschriebenen Parameter weist Nachteile auf, die zum Teil durch Verwendung eines anderen Parameters wieder aufgehoben werden können. Somit erscheint es sinnvoll, zur Beurteilung der Diabeteskontrolle der Patienten dieser Studie, alle vier Parameter heranzuziehen.

2. Diskussion der Ergebnisse aus der Bestimmung des C-Peptides

2 A. Diskussion der Methoden

Im Rahmen der C-Peptidbestimmung von Seren insulinbehandelter Diabetiker erweist sich die Bindung des antikörpergebundenen humanen Proinsulins an den Antikörper des C-Peptid Assays als ein wesentliches methodisches Problem. Diese Kreuzreaktion des C-Peptid-Antikörpers mit dem humanen Proinsulin kann bei hohen Serumkonzentrationen antikörpergebundenen Proinsulins zu falsch hohen C-Peptidwerten führen (39 / 82 / 83). Aus diesem Grunde wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eine Abtrennung des Proinsulins vor der Anwendung des C-Peptid Assays gefordert.
Eine vorherige Abtrennung des Proinsulins ist indes beim C-Peptid Assay der Seren von Stoffwechselgesunden nicht notwendig. Bei diesen ist die Konzentration des Proinsulins im peripheren Blut im Vergleich zur Konzentration des C-Peptides vernachlässigbar. Im Nüchternserum von 46 Nichtdiabetikern wurde eine durchschnittliche C-Peptidkonzentration von 0,39 pmol/ml, und eine 29 fach geringere Konzentration an humanem Proinsulin beobachtet (82). Da die, in den verschiedenen C-Peptid Assays verwendeten Antikörper gegen humanes C-Peptid, in gleichem bzw. teils sogar geringerem Ausmaß mit humanem Proinsulin kreuzreagieren, führt das in den Seren von Stoffwechselgesunden enthaltene Proinsulin zu keiner signifikanten Veränderung der tatsächlichen C-Peptidkonzentration. Dagegen können bei insulinbehandelten Diabetikern Proinsulinkonzentrationen beobachtet werden, die wesentlich höher sind als die des C-Peptides (84 / 85).

Durch die Bindung des sezernierten humanen Proinsulins an Insulinantikörper (es wird der Insulinteil des humanen Proinsulins gebunden) wird die Clearance des Proinsulins verzögert (83), wodurch eine Akkumulation des sezernierten Proinsulins im peripheren Blut erfolgen kann. Einen guten Eindruck vom Ausmaß, den die Proinsulinkonzentrationen im Serum von insulinspritzenden Diabetikern zu erreichen vermögen, vermittelt eine Veröffentlichung von Heding (82). Bei 24 insulinabhängigen Diabetikern wurden Konzentrationen an humanem Proinsulin zwischen 0,09 und 9,4 pmol/ ml bestimmt.

Diese Zahlen unterstreichen, daß bei der C-Peptidbestimmung der Seren von insulinbehandelten Diabetikern, eine Abtrennung des antikörpergebundenen Proinsulins unbedingt erforderlich ist, um das Risiko zu vermeiden, falsch hohe C-Peptidwerte zu erhalten.

Der in vorliegender Studie verwendete Antikörper M 1230 weist zwar mit 11 % eine vergleichsweise niedrige Kreuzreaktivität mit Proinsulin auf, eine Abtrennung des antikörpergebundenen Proinsulins ist, wie aus der oben zitierten Studie hervorgeht, dennoch nötig. Diese wurde von uns vermittels der PEG-Vorbehandlung der Seren (s. Methoden) durchgeführt - einer einfachen und schnellen Methode zur Fällung antikörpergebundener Peptidhormone. Wir fanden weder einen Einfluß der PEG-Vorbehandlung auf den Verlauf der Standardkurve noch zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Nüchternwerten von stoffwechselgesunden Probanden, die einmal mit und einmal ohne PEG-Vorbehandlung der Seren ermittelt wurden. Unsere Ergebnisse bestätigten die Aussage von Kuzuya et al. (39), daß die PEG-Methode zur Abtrennung von antikörpergebundenem Proinsulin geeignet sei.

Eine andere Methode, die zur Abtrennung des Proinsulins vor einer Bestimmung des C-Peptides verwendet werden kann, wurde von Heding (27) entwickelt. Nach einer Säureextraktion wird das vom Antikörper gelöste Insulin und Proinsulin an Insulinantikörper gebunden, die an Sepharose gekoppelt sind (S-AIS). C-Peptid wird im Überstand nach Zentrifugation des an S-AIS gebundenen Proinsulins bestimmt. Ein Nachteil dieser Methodik im Vergleich zur unkomplizierten und schnellen PEG-Fällung liegt im relativ langwierigen Verfahren der Bindung der Insulinantikörper an Sepharose und der Erfordernis, diesen Antikörper erst zu gewinnen. Ein Vorteil dieser Methodik ist, daß sowohl das freie Proinsulin als auch das antikörpergebundene abgetrennt werden kann. Bei PEG-Fällung wird dagegen nur das antikörpergebundene Proinsulin ausgefällt. Da das freie, im Äquilibrium mit dem gebundenem stehende Proinsulin, einem schnelleren Abbau unterliegt und es bisher keinen Anhalt dafür gibt, daß die B-Zelle des insulinabhängigen Diabetikers mehr Proinsulin sezerniert als die des Nichtdiabetikers, ist anzunehmen, daß das freie Proinsulin einen geringen Anteil am gesamten Proinsu-

lin hat. Das freie Proinsulin des insulinbedürftigen Diabetikers hat somit sehr wahrscheinlich einen zu vernachlässigenden Einfluß auf die Höhe des gemessenen C-Peptides.

Als ein weiteres Problem des C-Peptid Assays erweist sich die Interpretation der gemessenen C-Peptidwerte. C-Peptidkonzentrationen, die mit verschiedenen Assays bestimmt werden, sind nur bedingt vergleichbar.

Der Normalbereich des C-Peptides in Nüchternseren von Nichtdiabetikern variiert in Studien, die mit unterschiedlichen Assaysystemen durchgeführt wurden. Die Nüchternwerte lagen in einem Bereich zwischen 0,18 und 1,2 pmol/ml (82 / 60 / 23). Diese außerordentliche Streubreite der Fastenwerte läßt vermuten, daß sich die verwendeten C-Peptidassays in wesentlichen Faktoren unterscheiden. Als ein Faktor erwiesen sich die Charakteristiken des im Assay verwendeten Antikörpers gegen humanes C-Peptid. Das Plasma C-Peptid im Nüchternserum von zehn Stoffwechselgesunden zeigte beträchtliche Differenzen, wenn es mit unterschiedlichen Antiseren in parallelen Assays ermittelt wurde (60). Diesem mag eine divergierende Reaktivität der Antiseren mit dem Plasma C-Peptid oder mit Fragmenten des C-Peptides im Plasma zugrundeliegen (86). Hinweise dafür, daß das immunoreaktive C-Peptid in mehr als einer Form besteht, wurden von Kuzuya et al. (86) gefunden. In Extrakten des humanen Pankreas entdeckten Heding et al. (87) ein 1-24 C-Peptidfragment. Bislang ist ungeklärt, ob diese Bruchstücke bereits im peripheren Blut in vivo vorhanden sind oder erst durch Abbauprozesse in vitro entstehen. Die Frage nach der Relvanz dieser Fragmente ist daher noch nicht beantwortet.
Eine weitere Ursache für die variierenden Meßergebnisse der C-Peptidassaysysteme könnte in Abbauprozessen des C-Peptides begründet sein, die in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer und -temperatur der Seren eintreten. Ein Lagerungsexperiment zeigte, daß die C-Peptid Immunoreaktivität (CPI) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer und -temperatur abnehmen kann (60). Ein in vitro Abbau des C-Peptides könnte dies bewirkt haben.
Zusätzlich finden sich Hinweise, daß die Art des verwendeten Tracers, des Standards und die Assaytechnik, die Höhe der ermittel-

ten C-Peptidkonzentrationen beeinflußen (87).
Dies alles führt vor Augen, daß eine absolute Vergleichbarkeit der C-Peptidwerte, die mit verschiedenen Assaysystemen bestimmt wurden, nicht gegeben ist. Die Meßergebnisse eines Assaysystems sind jedoch untereinander vergleichbar, falls eine optimale Lagerungstemperatur der Seren eingehalten, und eine bestimmte Lagerungsdauer nicht überschritten wurde.
Seren, die ein Jahr bei -25°C gelagert und mit dem Antikörper M 1230 (dieser Antikörper fand auch beim C-Peptid Assay der vorliegenden Studie Verwendung) gemessen wurden, wiesen keine Änderung der CPI auf (60). Die Patientenseren der vorliegenden Arbeit waren bei einer nämlichen Temperatur gelagert und wurden spätestens nach einem Jahr dem C-Peptid Assay zugeführt. Es ist daher wahrscheinlich, daß die ursprüngliche C-Peptid Immunoreaktivität unserer Seren erhalten blieb.
Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, daß der von uns verwendete Antikörper eine relativ hohe Sensitivität aufweist und Normalseren, die mit diesem Antikörper gemessen wurden, vergleichsweise niedrige CPI-Werte hatten (60).
Insbesondere daraus, daß die C-Peptidmeßergebnisse je nach Art des verwendeten Antikörpers divergieren können, folgt, daß eine exakte Aussage über die C-Peptidkonzentration im peripheren Blut nicht möglich ist.

Als ein weiteres Problem des C-Peptid Assays erweist sich die Festsetzung einer unteren Nachweisgrenze. Allein die Seren langjähriger Diabetiker eignen sich als Nullwerte, wobei sich jedoch nicht mit Sicherheit ausschließen läßt, daß diese Diabetiker nicht immer noch über eine minimale B-Zellfunktion verfügen. Faber et al. (60) verwendeten die Stimulierbarkeit der B-Zellfunktion als Kriterium dafür, wann ein gemessener CPI-Wert noch als C-Peptid anzusehen sei. Nach einer Stimulation mit 1 mg Glucagon, stieg das Plasma C-Peptid von 10 insulinbehandelten Diabetikern mit einer Diabetesdauer von mehr als 10 Jahren nicht an. Faber interpretierte die gemessene nicht stimulierbare C-Peptid Immunoreaktivität im Serum dieser Patienten als "unspezifische Abtrennung vom Tracer". Je nach Antikörper war diese Abtrennung vom Tracer verschieden hoch. Sie reichte von 0 bis 0,22 pmol/ml. Für den Antikörper M 1230 ergab

sich ein nicht stimulierbarer Bereich der Plasma CPI von 0 bis 0,06 pmol/ml. Hendriksen et al. (35), die diesen Antikörper in einer Studie verwendeten, definierten 0,06 pmol/ml als Nachweisgrenze. Für die Unsicherheit bei der Festlegung dieser Nachweisgrenze spricht, daß z.B. Heding (82) die Nachweisgrenze für den Antikörper M 1181 bei 0,03 pmol/ml angab, dagegen Faber (60) für diesen Antikörper einen Bereich des 0-Plasmas zwischen 0 und 0,07 pmol/ml bestimmte. Aus verschiedenen Gründen übernahmen wir nicht die Nachweisgrenze, die Faber et al. für den Antikörper M 1230 definierten (s. o.). Zum einen zeigten Seren von langjährig insulinbehandelten Diabetikern (s. Methoden), mit der PEG-Methode gemessen, tatsächliche Nullwerte. Zum anderen wiesen zwei Diabetikerinnen (R.B. und I.F.), die CPI-Werte um 0,03 pmol/ml hatten, und ein Diabetiker (J.E.), der CPI-Werte stets unter 0,02 pmol/ml hatte, eine Stimulierbarkeit der B-Zellen durch Glucose auf. Daß es sich bei den CPI-Werten dieser drei Patienten um humanes C-Peptid handelte und nicht um eine unspezifische Abtrennung vom Tracer, erscheint aufgrund des ähnlichen Verlaufes von CPI-Werten und Serumglucose eindeutig (s. Abb. 8.1, 8.2 und 8.7).

Die von Mensch zu Mensch unterschiedlichen molaren Verhältnisse von C-Peptid und Insulin im peripheren Blut, erschweren beim insulinabhängigen Diabetiker den Schluß vom in der Peripherie bestimmten C-Peptid auf die Konzentration des von der B-Zelle abgegebenen Insulins bzw. die Serumkonzentration des endogenen Insulins in der Portalvene (82). Die C-Peptidbestimmung im peripheren Blut ermöglicht zwar einen guten Einblick in die Sekretionsdynamik der B-Zellen (23 / 24 / 25), beim insulinbehandelten Diabetiker wie beim Stoffwechselgesunden, eine quantitative Auskunft über die tatsächlich sezernierte Insulinmenge vermag sie jedoch nur ungefähr zu geben. Konkret für die Befunde dieser Studie heißt das, daß zwar der mittlere CPI-Wert des Diabetikers V.G. mit 0,12 pmol/ml viermal so hoch ist wie der, der Patientin I.F., doch sich die peripheren endogenen Insulinspiegel beider Patienten, bei denkbaren molaren Verhältnissen von Insulin zu C-Peptid von 1 : 4 bzw. 1 : 16 (s. 82), sogar entsprechen könnten. Beide Diabetiker hätten damit (einen identischen Insulinabbau in der Leber vorausgesetzt), trotz sehr unterschiedlicher CPI-Werte, eine vergleich-

bare B-Zellrestfunktion.

2 B. Diskussion der Ergebnisse

Acht der 20 Diabetiker hatten eine residuale B-Zellfunktion. Dieser Anteil entspricht in etwa den 45 %, die in drei Studien (24 / 35 / 88) an insgesamt 157 Patienten gefunden wurden. Das Alter bei Diabetesbeginn dieser insulinbehandelten Diabetiker lag unterhalb des 16. Lebensjahres - der Bereich der Diabetesdauer war jedoch mit dem der Gruppe vorliegender Studie vergleichbar.

Aus den Daten der zwanzig Patienten war zu ersehen, daß mit zunehmender Diabetesdauer das Vorkommen einer residualen B-Zellfunktion seltener wurde. Mit Ausnahme des Patienten E.R. war die Diabetesdauer der Patienten mit einer B-Zellrestfunktion weniger als fünf Jahre. Dagegen hatte nur ein Patient der Gruppe ohne meßbares C-Peptid eine Diabetesdauer unter fünf Jahren.
In einer umfangreichen Studie fanden Madsbad et al. (89), daß annähernd 100 % der Patienten mit einer Diabetesdauer bis zu zwei Jahren noch eine Restfunktion der B-Zellen aufwiesen, während nur 15 % der Diabetiker mit einer Krankheitsdauer von mehr als 15 Jahren noch C-Peptid sezernierten.
Morphologische Studien (90) an den Langerhansschen Inseln von 58 insulinbehandelten Diabetikern, die bei Diabetesbeginn ein Alter von unter 40 Jahren hatten, bestätigten obigen Befund. Das Vorkommen von B-Zellen nahm in Beziehung zur Diabetesdauer in einem ähnlichen Verhältnis ab, wie es für die C-Peptidsekretion beobachtet wurde. Die Zahl der B-Zellen insulinbehandelter Diabetiker war im Vergleich zum Normalen ausnahmslos vermindert.
Dies läßt als naheliegend erscheinen, daß der veringerten Insulinsekretionskapazität des Diabetikers vom juvenilen Typ, eine Reduktion der Zahl der B-Zellen entspricht, zumal die untersuchten Zellen Zeichen einer Hyperaktivität und nicht etwa einer reduzierten Sekretion zeigten.

Das Alter bei Auftreten der Erstsymptomatik war bei den acht Diabetikern mit einer residualen Insulinsekretion signifikant ($p < 0,05$) höher als bei den Diabetikern ohne diese Funktion. Hierbei mag es sich um ein zufälliges Ergebnis handeln, das sich aus der Relation von Altersverteilung und Diabetesdauer dieses Kollektivs erklärt. Eine Arbeitsgruppe (89) entdeckte jedoch, daß das Vorkommen einer B-Zellfunktion bei insulinbehandelten Diabetikern mit gleicher Diabetesdauer desto häufiger war, je älter die Patienten zu Beginn des Diabetes waren.

Von den übrigen Patienten mit einer residualen B-Zellfunktion hebt sich der Diabetiker E.R. ab. Noch nach 16 Jahren Diabetesdauer sezernierte er Insulin. Ein derart langes Persistieren der B-Zellfunktion ist zwar kein häufiges Vorkommnis, ähnliches wurde jedoch von mehreren Arbeitsgruppen beobachtet (29 / 35 / 89). W. Gepts (90) konnte in den Langerhansschen Inseln von Diabetikern mit einer Diabetesdauer bis zu 23 Jahren noch B-Zellen vorfinden. Warum beim einen Patienten die B-Zellfunktion, wenn auch in geringem Ausmaß, länger persistiert als beim anderen, ist bisher nicht definitiv verstanden. Es gibt Hinweise, daß eine Intensivierung der Insulintherapie zu Diabetesbeginn einen positiven Einfluß auf das Weiterbestehen einer residualen B-Zellfunktion haben könnte (36 / 91 / 92). Weiterhin wurde angenommen, daß sich zirkulierende Insulinantikörper an die B-Zellen anlagern, dadurch einen Stimulus für vermehrte Sekretion bilden und durch diese ständige, unphysiologische Stimulation zu einem beschleunigten B-Zelluntergang führen (36 / 93). Autoren, die diese Hypothese vertreten, stützen sich insbesondere auf in vitro-Studien (94 / 95 / 96).

Zwischen den in vorliegender Studie dargestellten Diabetikern mit und ohne C-Peptid, zeigte sich in Hinblick auf die verabreichte Insulindosis am Abnahmetag, kein signifikanter Unterschied. In zwei Studien (35 / 97) an 36 bzw. 17 Diabetikern wurde dagegen gefunden, daß mit zunehmender Höhe des C-Peptidspiegels, die benötigte Insulindosis niedriger war ($p < 0,003$ bzw. $p < 0,04$). Auch bei unserem Kollektiv von acht Patienten ergab sich eine

negative Korrelation zwischen der verabreichten Insulindosis und dem durchschnittlichen C-Peptid. Die Korrelation lag jedoch knapp unterhalb des vorgegebenen Signifikanzniveaus von 5 %. Das für eine statistische Auswertung etwas kleine Kollektiv könnte das Ausbleiben einer signifikanten Korrelation erklären. In Anbetracht der Befunde beider Studien (35 / 97) wäre zu erwarten, daß der Insulinbedarf von Patienten ohne residuale B-Zellfunktion signifikant höher liegt als der von Diabetikern mit dieser Funktion. Doch zeichnete sich weder in unserer Studie, noch in einer vergleichbaren von W. Beischer (98) derartiges ab.

Die mittleren C-Peptidwerte der acht Diabetiker lagen zwischen 0,01 und 0,33 pmol/ml. Die Werte waren damit unterhalb des Normalbereiches. O.K. Faber, der C-Peptid ebenfalls mit dem von uns verwendeten Antikörper M 1230 bestimmte, ermittelte bei zehn Nichtdiabetikern C-Peptidspiegel über den Tag, die von 0,42 bis 0,96 pmol/ml reichten (97). Die C-Peptidkonzentrationen, die Faber et al. (97) bei 17 Diabetikern, die seit zwei bis vier Wochen mit Insulin therapiert wurden, ermittelten, waren mit 0,07 bis 0,55 pmol/ml in einem vergleichbaren Bereich wie die Werte vorliegender Arbeit.

Das zunächst auffallendste an der C-Peptid- und damit Insulinsekretion der acht insulinpflichtigen Diabetiker ist, daß Änderungen im Verhalten der C-Peptidsekretion gleichsinnig mit den Konzentrationsschwankungen der Serumglucose verliefen (s. Abb. 6). Dies äußerte sich in den signifikanten Korrelationen der C-Peptid- mit den Glucosewerten und entspricht den Beobachtungen über das Verhalten der C-Peptidsekretion von Stoffwechselgesunden über den Tagesverlauf (40 / 97 / 98). Erwähnenswert ist, daß auch die Patienten mit einer sehr geringen B-Zellrestfunktion eine gute Signifikanz der Korrelation zwischen C-Peptid und Serumglucose vorwiesen. Ein Anhalt dafür, daß nach einem Ansteigen der Serumglucose die Sekretion des C-Peptides verzögert erfolgt, ist aus den Abbildungen 8.1 bis 8.8 nicht zu ersehen. Eine nach Stimulation durch Glucose verzögert eintretende Insulinsekretion ist kennzeichnend für das Sekretionsverhalten der B-Zellen von

Altersdiabetikern. Teilweise aus den Tagesverläufen des C-Peptides der anderen Patienten, am offensichtlichsten jedoch aus den C-Peptid- und Glucoseprofilen des Diabetikers V.G. (s. Abb. 85) ist zu erkennen, daß die C-Peptidsekretion auch bei abnorm hohen Glucosewerten, in diesem Fall bei Werten um 300 mg/dl noch deutlich dem Anstieg und Abfall der Serumglucose folgt. Dieses, bei den acht insulinpflichtigen Diabetikern zu beobachtende Verhalten der C-Peptidsekretion bei hohen Glucosewerten, steht in Einklang mit Untersuchungen des Sekretionsmodus isolierter B-Zellen (99). Aus all dem, der signifikanten Korrelation zwischen den C-Peptid- und Serumglucosewerten, dem Ausbleiben einer verzögerten C-Peptidsekretion, der Ansprechbarkeit der B-Zellen auch auf Veränderungen der Glucosewerte innerhalb von Konzentrationen, die über dem physiologischen Bereich liegen, kann geschlossen werden, daß bei den B-Zellen dieser acht Diabetiker zumindest die Fähigkeit intakt geblieben ist, auf Änderungen der Blutglucose mit einer Sekretion an Insulin zu reagieren.

Morphologisch intakte B-Zellen, die außer von Zeichen, die für eine hyperaktive Sekretproduktion sprechen, keine Abnormität erkennen ließen, wurden von W. Gepts (90) in den pseudoatrophischen Langerhansschen Inseln und neugebildeten Inseln von teilweise langjährig insulinbehandelten Diabetikern gefunden. Vergleichbar den Befunden unserer Studie, wurde bei 17 insulinabhängigen Diabetikern eine signifikante Korrelation zwischen der Blutglucose und dem C-Peptid angetroffen (100). C-Peptid wurde bei dieser Studie während der ersten elf Monate der Insulinbehandlung der Patienten bestimmt. Faber et al. schlossen aus ihren Ergebnissen, daß das fortschreitende B-Zellversagen insulinpflichtiger Diabetiker wahrscheinlich ein quantitatives und nicht ein qualitatives Phänomen ist. Unsere Ergebnisse lassen dieselbe Schlußfolgerung zu und legen überdies nahe, daß auch nach Jahren der Insulintherapie und Diabetesdauer kein qualitativer Unterschied zwischen dem Sekretionsmodus der B-Zellen insulinpflichtiger Diabetiker vom juvenilen Typ und dem von Nichtdiabetikern besteht.

Nun gibt es einige Arbeiten, die diesbezüglich zu andersartigen Ergebnissen gekommen sind:
Eine verzögerte C-Peptidsekretion bei insulinbehandelten Diabetikern wurde in zwei Studien (30 / 31) postuliert. Hier wurde C-Peptid nach einem oralen Glucosetoleranztest bestimmt. Die Population beider Studien umfaßte eine große Anzahl von Diabetikern mit einer Erstmanifestation des Diabetes nach dem 40. Lebensjahr. Bei der Mehrzahl der Diabetiker, deren Diabetes nach dem 40. Lebensjahr begann, ist anzunehmen, daß es sich um Altersdiabetiker handelt, bei denen sich nach einer Stimulation mit Glucose eine charakteristisch verzögerte Insulinsekretion zeigt. Die Befunde aus beiden Untersuchungen sind deshalb mit Vorbehalt auf ein jüngeres Diabetikerkollektiv zu übertragen. Überdies wurden von beiden Arbeitsgruppen wenig sensitive Assays verwendet, und antikörpergebundenes Proinsulin wurde in beiden C-Peptid Assays mitbestimmt.
Nach einer Glucagoninfusion wiesen nur drei von zehn diabetischen, insulinbehandelten Kindern einen signifikanten, jedoch schwachen Anstieg des C-Peptides auf (101). Die fragliche Wertigkeit der künstlichen Untersuchungsbedingungen könnte eine Erklärungsmöglichkeit für diesen, von den anderen dargestellten Ergebnissen, stark abweichenden Befund sein.

Ein zentrales Ergebnis aus der Messung des Serum C-Peptides ist, daß die acht Diabetiker mit C-Peptid eine bessere Glucoseeinstellung hatten als die zwölf Diabetiker ohne C-Peptid. Sie waren in drei der vier verwendeten Parameter der Glucoseeinstellung signifikant besser eingestellt. Die 24^{h}-Profile der Serumglucose von Abb. 7 weisen sie eindrucksvoll als in besserer metabolischer Kontrolle befindlich aus. Wie in den Ergebnissen ausgeführt, zeigen jedoch manche der Diabetiker ohne B-Zellfunktion eine vergleichbare oder sogar bessere Glucosekontrolle als einige der Diabetiker mit C-Peptid.

Diese Beobachtung entspricht auch in etwa den Darstellungen von Beischer et al. (98), die ihre Diabetiker in Gruppen mit guter, ausreichender und schlechter metabolischer Kontrolle einteilten.

Die Mehrzahl der Patienten mit C-Peptid waren nach ihren Kriterien gut bis ausreichend eingestellt, während die meisten (nicht alle) Diabetiker ohne B-Zellfunktion der schlecht eingestellten Gruppe angehörten.

Zu dem in den Ergebnissen dargestellten Befund, daß für keinen der vier Parameter der Glucoseeinstellung eine signifikante negative Korrelation mit dem durchschnittlichen C-Peptid der acht Patienten bestand, ist anzumerken, daß dies im Widerspruch zu einigen anderen Studien (29 / 97 / 100) steht. Diese kamen zur Beobachtung, daß je geringer die residuale B-Zellfunktion war, desto schlechter war auch die Stoffwechselkontrolle.

Als Anmerkung zur Diskussion der Ergebnisse aus der Bestimmung des Serum C-Peptides, seien einige Gedanken zur Auswirkung der residualen B-Zellfunktion insulinbehandelter Diabetiker auf die metabolische Kontrolle dargelegt.

Wie ist es vorstellbar, daß auch eine im Vergleich zum Nichtdiabetiker oft zehnfach geringere B-Zellfunktion einen positiven Einfluß auf den Glucosestoffwechsel ausüben kann - bei gleichzeitig bestehenden, oft sehr hohen Konzentrationen an exogenem freien und antikörpergebundenem Insulin, sowie zirkulierenden insulinbindenden Antikörpern?

Die einfachste Erklärungsmöglichkeit ist wohl, daß das residuale stimulusgerecht sezernierte Insulin vor allem einen positiven Einfluß auf die hepatische Glycogensynthese, die Hemmung der Gluconeogenese sowie die Hemmung der Glycogenolyse ausübt (102 / 103). Dies trifft jedoch nur zu, falls das noch sezernierte Insulin die Leber als stoffwechselwirksames Insulin erreicht. Gerade dies ist eher unwahrscheinlich bei Diabetikern, die Antikörper gegen das injizierte Insulin gebildet haben. Bei sieben der acht Diabetiker mit C-Peptid war es zu einer meßbaren Antikörperbildung gegen Insulin gekommen (s. Ergebnisse). Diese Antikörper reagieren mit dem sezernierten autologen Insulin kreuz. Es ist deswegen denkbar,

daß ein Großteil des sezernierten Insulins bereits vor Erreichen der Leber an zirkulierende Insulinantikörper gebunden wird und damit vermutlich für die Dauer der Bindung an die Antikörper stoffwechselunwirksam ist.

Morphologische Untersuchungen an den Langerhansschen Inseln und Studien, bei denen eine Messung des immunoreaktiven Glucagons (IRG) erfolgte, bieten eine andere Erklärung für die offensichtlich günstige Auswirkung einer B-Zellreserve auf die Glucosehomöostase an.

Morphologische Befunde, die von Orci et al. (104 / 105) erhoben wurden, und die gegenseitige Einflußnahme der Hormone der Langerhansschen Inseln auf das Sekretionsverhalten ihrer Zellen (106 / 107 / 108 / 109 / 110 / 111), legen die Annahme nahe, daß es sich bei der Langerhansschen Insel um ein funktionelles Synzitium handelt (Übersicht bei 112). Unter anderem ist eine Hemmung der Glucagonsekretion durch Insulin, und eine Stimulierung der Insulinsekretion durch Glucagon bekannt (107 / 108). Die Hemmung der Glucagonsekretion durch Insulin müßte bei einem typischen Insulinmangeldiabetes vermindert bis aufgehoben sein. Tatsächlich wurde von mehreren Autoren eine Störung der Glucagonsekretion bei Diabetikern beobachtet (29 / 113 / 114 / 115 / 116). Unger (113), Gerich (114) und Mc Garry (115) fanden, daß Glucagon eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung des vollen diabetischen Syndroms mit Hyperglykämie und Hyperketonämie spielt. Reynolds et al. (29) stellten bei den von ihnen untersuchten insulinpflichtigen Diabetikern fest, daß nur dann kompensatorisch genügend Glucagon bei einer Hypoglykämie ausgeschüttet wurde, wenn auch die B-Zellfunktion, die Insulinsekretion noch weitgehend intakt war. Bestand nur eine sehr geringe B-Zellfunktion, so war auch die zusätzliche Glucagonausschüttung bei einer Hypoglykämie insuffizient. Somit wären Diabetiker mit einer geringen oder nicht mehr vorhandenen B-Zellfunktion, einerseits durch zu hohe Glucagonspiegel benachteiligt und andererseits durch die verminderte Fähigkeit, einem starken Glucoseabfall durch eine ausreichende Glu-

cagonsekretion zu begegnen. Diese, vermutlich durch einen Mangel an B-Zellen, an ausreichender Insulinsekretion bedingte Störung der Glucagonsekretion, könnte mit die Ursache für den labilen Diabetes sein, der sich durch therapeutisch schwer beherrschbare Schwankungen der Blutglucose auszeichnet.

Umgekehrt, um die in diesem Abschnitt eingangs gestellte Frage zu beantworten, könnte ein stabiler Diabetes, der sich, wie oben ausgeführt, in der Regel durch eine relativ hohe B-Zellrestfunktion auszeichnet, vor allem durch das mehr oder weniger gute Funktionieren des Zusammenspiels der Komponenten der Langerhansschen Insel, respektive der Glucagonsekretion, bedingt sein.

Im Anschluß an die Diskussion der Ergebnisse aus der Bestimmung des C-Peptides sei die Erörterung eines Befundes angefügt, der sehr wahrscheinlich im Zusammenhang mit den Erkenntnissen, die wir über die residuale B-Zellfunktion haben, zu sehen ist.

Es ergab sich für die 20 Diabetiker dieser Studie eine signifikante ($p < 0{,}05$) bis hochsignifikante ($p < 0{,}005$) Korrelation zwischen den Parametern der Glucoseeinstellung, MAGE, MBG und M-value und der Diabetesdauer, sowie der Dauer der Insulinbehandlung. Die metabolische Kontrolle der Patienten war somit mit zunehmender Dauer des Diabetes unzureichender. Es ist naheliegend, die Ursache für diesen Befund in der residualen Insulinsekretion zu sehen. Einerseits nimmt die B-Zellrestfunktion mit dem Andauern der diabetischen Stoffwechselstörung ab (89 / 100), andererseits ist die Glucoseeinstellung eng mit dem Ausmaß der B-Zellfunktion verknüpft (29 / 97 / 100). Dementsprechend hatten die Patienten mit C-Peptid - wie in den Ergebnissen dargestellt - eine kürzere Diabetesdauer und waren besser eingestellt als das übrige Kollektiv.

3. Diskussion der Ergebnisse aus der Bestimmung des freien und des antikörpergebundenen Insulins, sowie aus der Charakterisierung der Insulinantikörper

3 A. Diskussion der Methoden

Die subkutane Verabreichung von artfremdem Rinder- oder Schweineinsulin führt beim Menschen zur Entstehung von Antikörpern gegen dieses injizierte Insulin und insbesondere bei den nicht hochgereinigten Insulinen, zur Bildung von Antikörpern gegen "Verunreinigungen" der Insulinpräparationen, wie Rinder- und Schweineproinsulin, Proinsulin-ähnliche Peptide, pancreatic polypeptide und Glucagon (117). Die gegen das artfremde Insulin gebildeten Antikörper reagieren mit dem bei Diabetesbeginn in der Regel noch sezernierten, endogenen Insulin kreuz. Die Antikörperbildung gegen das Insulin kann alle fünf Immunglobulinklassen betreffen. Quantitativ im Vordergrund stehend und bei der Mehrzahl der insulinbehandelten Diabetiker auffindbar, sind die Antikörper vom IgG-Typ (118). IgM wurde nur vorübergehend zu Beginn der Insulintherapie gefunden (119) und spielt möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung der Insulinresistenz (119 / 120). IgE scheint eine Bedeutung bei der Insulinallergie zuzukommen (121).

Die klinische Bedeutung der Insulinantikörper, insbesondere ihre Auswirkung auf den Insulinbedarf, die Stoffwechseleinstellung und die Spätkomplikationen, ist noch Gegenstand der Diskussion. Sie könnte in einer Neutralisierung des verabreichten und des endogenen Insulins liegen und - oder - in der Bildung von Immunkomplexen, die Sekundärreaktionen im Sinne einer Immunkomplex-Vaskulitis bewirken (122 / 123).

Eine besondere Bedeutung kommt den Insulinantikörpern bei der Messung von Insulin im Serum von insulinbehandelten Diabetikern zu. Mit den herkömmlichen Radioimmunoassays (RIA) durchgeführt, werden Insulinmessungen bei diesem Kollektiv durch die Interferenz der Insulinantikörper im RIA im höchsten Maße ungenau und

damit nicht verwertbar (124). Im Blut von Diabetikern mit Insulinantikörpern sind nach allgemeiner Auffassung, freies Insulin und antikörpergebundenes Insulin im Äquilibrium. Eine Messung der Konzentration des freien Insulins erfordert daher eine Abtrennung der Insulin-Insulinantikörper-Komplexe, ohne dieses Äquilibrium zu stören. Ebenso ist für die Bestimmung der Konzentration des gesamten im Serum enthaltenen Insulins (Gesamt-Insulin), eine möglichst vollständige Abtrennung des an die Antikörper gebundenen Insulins vom Antikörper notwendig. Die anschließende Fällung der Antikörper sollte erfolgen, ohne daß eine erneute Assoziation des Insulins an die Antikörper eintreten kann.

Als Methoden, um das freie Insulin zu bestimmen, wurden die Ultrazentrifugationsmethode (125) und eine Extraktionsmethode mit neutralem Äthanol beschrieben (126). Die erste Methode bedarf eines umfangreichen Instrumentariums und bei der Methode mit neutralem Äthanol scheint bei Seren mit hohem Antikörpertiter etwas antikörpergebundenes Insulin extrahiert zu werden (38).

In dieser Studie wurde die PEG-Fällung zur Bestimmung des freien und des antikörpergebundenen Insulins angewandt (s. Methoden). Unsere Voruntersuchungen zeigten, daß PEG keinen nennenswerten Betrag des freien Insulins präzipitiert. Wiederholtes Waschen und Fällen mit PEG führte zu keiner signifikanten Dissoziation des gebundenen Insulins vom Antikörper. Eine Störung des Äquilibriums zwischen freiem und gebundenem Insulin scheint somit durch die PEG-Präzipitation nicht gegeben zu sein. Die PEG-Behandlung eines Serums führte zu einer vollständigen Abtrennung der Gammaglobulinfraktion und damit auch der Insulinantikörper. Dies entspricht Befunden, daß bei PEG-Behandlung nur Proteine mit hohem Molekulargewicht ausgefällt werden (37 / 127). Das antikörpergebundene Insulin wurde aus der Differenz zwischen der gemessenen Konzentration des freien und des Gesamt-Insulins ermittelt. Die Wiederfindung bei der Bestimmung des Gesamt-Insulins war mit 95 $\pm$ 2 % vergleichbar der, die für die Messung des freien Insulins gefunden wurde (96 $\pm$ 2 %). Mit der PEG-Fällung steht somit eine

brauchbare, einfache und schnelle Methode zur Messung der Insulinfraktionen im Serum von insulinbehandelten Diabetikern zur Verfügung. Dies bestätigt die Erfahrung von anderen Arbeitsgruppen (38 / 39 / 124) mit dieser Methode.

Für ein Verfahren zur Ermittlung der Parameter der Antikörpercharakterisierung, der Assoziationskonstante (K) und der Bindungskapazität (Ab), wäre folgendes wünschenswert:
a) - das Verfahren sollte die Bindungseigenschaften der Insulinantikörper weder quantitativ noch qualitativ verändern,
b) - es sollte genau, präzise und wenig zeitaufwendig sein,
c) - es sollte den Verhältnissen in vivo möglichst angenähert sein.

Diese Bedingungen konnten in dieser Studie bei Verwendung der PEG-Fällung weitgehend eingehalten werden (s. Methoden).
Zu a) - Das PEG-Verfahren hatte keinen signifikanten Einfluß auf das Äquilibrium, das zwischen freiem und gebundenem Insulin besteht (s.o.). Die PEG-Behandlung führte zu keinem signifikanten Verlust der Bindungskapazität der Antikörper für Insulin. Eine quantitative oder qualitative Änderung der Bindungseigenschaften der Antikörper scheint demnach unter Anwendung der PEG-Präzipitation nicht einzutreten.
Zu b) - Das Verfahren, das unter dem Pipettierschema auf Seite 30 aufgeführt ist, ist verläßlich und relativ schnell. Unter Verwendung eines Computerprogrammes konnten die Sättigungsanalysen von zehn Proben innerhalb eines Tages durchgeführt werden.
Zu c) - Die Annäherung der Methode an in vivo Verhältnisse bleibt teilweise problematisch:
- Es ist zu hinterfragen, ob durch die Blutentnahme nicht ein möglicherweise bestehendes Gleichgewicht zwischen freiem Insulin, antikörpergebundenem Insulin und der Insulinfraktion, die an die Insulinrezeptoren gebunden ist, eine Störung erfährt und es dadurch in vitro zu einer Umverteilung der einzelnen Fraktionen kommt. Untersuchungen ergaben, daß die Serumspiegel des freien Insulins von der Assoziation und Dissoziation des Insulins an und vom Antikörper und dessen Bindungskapazität abhängen, sowie von der Abbaurate des freien Insulins, als auch von der Absorptionskinetik

des subkutan injizierten Insulins (39 / 128). In den Geweben mit zellgebundenen Rezeptoren für Insulin besteht ein Zustrom des Insulins vom Plasma über die Kapillarwand und die interstitielle Flüssigkeit zu den Insulinrezeptoren. Messungen der Bindung des Insulin an Monozyten und der Insulinkonzentration im Plasma sprechen dafür, daß bei Diabetikern, die nicht mit Insulin behandelt werden und bei Normalpersonen, die Konzentration des Plasmainsulin mit von der Zahl der zellgebundenen Rezeptoren für Insulin determiniert wird (129). Analog ist für die Verhältnisse bei insulinbehandelten Diabetikern zu vermuten, daß die Affinität und Bindungskapazität der Insulinrezeptoren ein weiteres Gleichgewicht für das freie Insulin oder gar das antikörpergebundene Insulin aufbauen. Trifft dies zu, ist das Gleichgewicht, das in vivo zwischen den einzelnen Insulinfraktionen besteht, nach einer Blutentnahme in vitro gestört. Somit ist nicht auszuschließen, daß unmittelbar nach einer Blutabnahme, eine Assoziation oder Dissoziation des Insulins an bzw. vom Antikörper als Folge des neuen Gleichgewichts eintritt.
Dem ist entgegenzuhalten, daß sich eine enge Korrelation zwischen antikörpergebundenem und freiem Insulin (g/f) auf der einen Seite und den Affinitätscharakteristika (Bindungskapazitäten und Assoziationskonstanten) auf der anderen Seite fand (19). Dies heißt, daß die Lage des oben beschriebenen Fließgleichgewichts und damit auch die Konzentration des freien Insulins, wesentlich durch die Affinität und Bindungskapazität der insulinbindenden Antikörper mitbestimmt werden. Anscheinend kommt den insulinbindenden Rezeptoren innerhalb dieses Gleichgewichts keine dominierende Rolle zu.

- Bezüglich der Temperatur und des pH-Wertes der Testansätze waren bei der Methode zur Antikörpercharakterisierung physiologische Verhältnisse gegeben.
- Durch Zugabe von Nullseren zu den Testansätzen wurde versucht, das in vitro Milieu, das durch die Pufferlösung gegeben war, weitgehend den Verhältnissen im Blut anzunähern.

3 B. Diskussion der Ergebnisse

Die Resultate aus der Bestimmung des freien und des Gesamt-Insulins sprechen dafür, daß es frühzeitig (nach Tagen) auch bei Gabe von hochgereinigten Rinder- oder Schweineinsulinpräparationen zur Bildung von Antikörpern gegen Insulin kommt. Bis auf den Diabetiker B.G. hatten alle Patienten Antikörper gegen das artfremde Insulin entwickelt. Sehr wahrscheinlich ist bei diesem Patienten das Ausbleiben einer nachweisbaren Antikörperbildung in der kurzen Zeitspanne, die die Insulintherapie umfaßte, begründet.
Verschiedene Arbeitsgruppen (Aufstellung bei 130) fanden ein Zeitintervall zwischen dem Beginn der Insulintherapie und dem ersten Auftreten von Insulinantikörpern, das von 2 bis 35 Tagen reichte. Andere beobachteten, daß erst nach Monaten oder gar Jahren der Insulintherapie, Insulinantikörper zum ersten Mal im Serum meßbar waren. Die letzgenannten Befunde mögen durch eine zu geringe Sensitivität der Meßmethodik vorgetäuscht worden sein. Das gleiche dürfte für die beträchtlich variierende Häufigkeit gelten, mit der Insulinantikörper im Serum von insulinbehandelten Diabetikern nachgewiesen wurden (130).

Bei den meisten Diabetikern dieser Studie (n = 17), lag das freie Insulin in einem relativ engen und niedrigen Konzentrationsbereich (1 - 57 mE/l; $\bar{x}$ = 27,7 mE/l). Dies entsprach den Meßwerten, die Gennaro et al. (124) bei einer Gruppe von 21 insulinbehandelten Diabetikern, ebenfalls unter Verwendung der PEG-Methode, ermittelt hatten (10 - 50 mE/l; $\bar{x}$ = 27,1 mE/l).
Vom übrigen Kollektiv der 20 Diabetiker hoben sich drei Patienten mit sehr hohen freien Insulinwerten ab (O.F. - $\bar{x}$ = 560 mE/l; R.H. - $\bar{x}$ = 517 mE/l; C.B. - $\bar{x}$ = 317 mE/l). Der Insulinbedarf dieser Patienten unterschied sich nicht von dem der anderen Diabetiker. Drei verschiedene Hypothesen könnten eine Erklärung für die hohen Konzentrationen des freien Insulins dieser Patienten bieten:
- die Abbaurate des Insulins könnte vermindert sein. Dies würde über eine erhöhte Halbwertszeit des frei zirkulierenden Insulins

zu einer Akkumulation des Insulins im Serum führen.
- die Absorptionskinetik des subkutan verabreichten Insulins könnte bei diesen drei Diabetikern zum übrigen Kollektiv, im Sinne einer hohen Absorptionsrate, verändert sein. Die tägliche Absorptionsrate des subkutan injizierten Insulins kann in einem Bereich schwanken, der von ca. 20 bis 100 % des verabreichten Insulins reicht (151). Sehr hohe Absorptionsraten könnten mit hohen Serumkonzentrationen des freien Insulins einhergehen.
- Die Insulinrezeptoren dieser drei Patienten könnten vermindert sein. Vom Rezeptorpool der peripheren Erfolgszellen wird vermutet, daß er große Mengen an Insulin binden und im Sinne eines Reservoirs wieder abgeben kann (132). Ist die Anzahl der Insulinrezeptoren vergleichsweise gering, kann weniger freies Insulin von diesem Pool gebunden werden und würde dadurch in höheren Konzentrationen frei zirkulieren.
Da bei den drei Patienten trotz der hohen Konzentrationen an freiem Insulin, die Blutglucosekonzentrationen nicht in hypoglykämische Bereiche abfielen, sondern im Gegenteil vergleichsweise hoch lagen (s. Tab. 3), scheint es gerechtfertigt von einer peripheren Insulinresistenz dieser Diabetiker zu sprechen. Eine der naheliegenden Ursachen für eine derartige Resistenz könnte eine verminderte Anzahl an Rezeptoren für Insulin sein.

Im Gegensatz zum freien Insulin variierte das antikörpergebundene Insulin von Patient zu Patient sehr stark (21 bis 2560 mE/l; s. Tab. 6). Bei manchem Diabetiker war im Vergleich zur Konzentration des freien Insulins im Serum, die 50 fache Menge Insulin an Antikörper gebunden. Dieses Verhältnis von antikörpergebundenem zu freiem Insulin war bei den drei Patienten J.W., V.G. und H.E. erheblich niedriger als im Durchschnitt (s. Tab. 8). Möglicherweise ist dies Ausdruck der erst beginnenden Antikörperbildung dieser Diabetiker, die weniger als einen Monat mit Insulin therapiert wurden.

Unsere Ergebnisse sprechen dafür, daß trotz zirkulierender Insulinantikörper eine direkte Auswirkung der Insulininjektion auf das freie Insulin gegeben ist. Sowohl die Summenkurve der 16 Dia-

betiker (s. Abb. 9 und 11) als auch die Einzelverläufe zeigen mit einiger Latenz zur Insulininjektion signifikante Anstiege des freien Insulins. Die bei den einzelnen Patienten bisweilen unterschiedliche Zeitdauer bis zum Auftreten eines Maximums des freien Insulins (s. Tab. 7), und die oft sehr verschieden ausgeprägte Steilheit des Anstiegs des freien Insulins nach einer Insulingabe, mögen teils Folge der verschiedenen Insulinpräparationen die Anwendung fanden, teils Auswirkung einer sich von Patient zu Patient ändernden Absorptionskinetik des subkutan injizierten Insulins sein. Die Absorptionskinetik hängt unter anderem vermutlich vom Durchblutungszustand des Einstichortes und vom Ort der Insulininjektion (Stamm oder Gliedmaßen) ab (133).
Unseren Ergebnissen entsprechend stellten Lewis et al. (40) einen Einfluß des verabreichten Insulins auf den Tagesverlauf des freien Insulins im Serum fest.

Die Beurteilung einer möglichen Abhängigkeit der Serumspiegel des antikörpergebundenen Insulins vom therapeutisch verabreichten Insulin ist nach den zur Verfügung stehenden Daten schwierig. Dem 24^{h}-Profil der 16 Diabetiker ist eine derartige Abhängigkeit nicht zu entnehmen (s. Abb. 9). Bei den Einzelprofilen (s. Abb. 11.1 - 11.20) treten die Maxima des gebundenen Insulins oft erst 10 Stunden und später nach einer Insulininjektion auf, sodaß die Zuordnung der jeweiligen Maxima zur morgendlichen oder abendlichen Insulingabe beim einzelnen Patienten schwerfallen kann. Darüberhinaus fanden sich bei manchen Diabetikern Schwankungen des antikörpergebundenen Insulins, die keiner Insulingabe zugeordnet werden konnten (s. die Abb. der Patienten R.H., C.B., E.B., L.S., M.S., E.R., I.F., J.W.). Die restlichen Diabetiker wiesen mit einer Latenz von meist 8 bis 10 h nach der Insulingabe ein Maximum des gebundenen Insulins auf. Eine definitive Auskunft zur Frage der Bindung des verabreichten Insulins an Insulinantikörper ist von Studien zu erwarten, bei denen die Insulinzufuhr intravenös erfolgt, da hier die Unwägbarkeiten der Absorption des subkutan injizierten Insulins nicht zum Tragen kommen. Diesbe-

zügliche Untersuchungen (134) zeigten, daß Konzentrationsänderungen des freien Insulins von schnellen Konzentrationsänderungen des antikörpergebundenen Insulins begleitet sind.

Die Konzentrationsschwankungen des antikörpergebundenen Insulins der Patienten dieser Studie umfassen häufig einen sehr weiten Bereich (s. Abb. 11 u. Tab. 8). Die Höhe dieser Schwankungen lassen sich weder durch den in vivo Abbau des gebundenen Insulins noch durch die Auswirkungen des exogen verabreichten Insulins erklären.
Insulinantikörper des Ig G Typs haben wie andere Antikörper dieser Klasse eine Halbwertszeit von ca. 23 Tagen. Die Halbwertszeit des antikörpergebundenen Insulins ist gegenüber der des freien Insulins im Serum beträchtlich verlängert (135), sodaß der bei manchen Patienten starke Konzentrationsabfall des gebundenen Insulins über den Tag schwerlich vom Abbau der Antikörperkomplexe herrühren kann.
Während es schwerfällt, eine Erklärung für die teilweise enormen Konzentrationsabfälle des antikörpergebundenen Insulins zu finden, bietet sich zumindest eine Hypothese an, mit der die Konzentrationsanstiege erklärt werden können, die zeitlich unabhängig zur Insulininjektion erfolgen:
Subkutan injiziertes Insulin wird über die Lymph- und Blutgefäße am Einstichort abtransportiert. Außer in der Milz finden sich vorwiegend in den Lymphknoten Plasmazellen - diejenigen Zellen in denen Antikörper synthetisiert werden. Ein Großteil des subkutan injizierten Insulins wird daher vermutlich vor Erreichen der Blutgefäße, bereits in den Lymphknoten und Lymphbahnen, an Insulinantikörper gebunden.
Häufige und starke Konzentrationsanstiege des antikörpergebundenen Insulins, die nicht in Einklang mit der Insulingabe zu bringen sind, könnten somit durch eine diskontinuierliche Freigabe der Insulinantikörperkomplexe aus dem Lymphgefäßsystem bedingt sein.

Zwischen den Mittelwerten des freien, sowie des antikörpergebundenen Insulins und der verabreichten Insulindosis pro Tag, be-

standen keine signifikanten Korrelationen. Es ist in Frage zu stellen, ob denn eine lineare positive Beziehung zwischen der Insulindosis und den Insulinfraktionen zu erwarten ist, da
- 1. - der Serumspiegel des freien Insulins außer von der Insulindosis die verabreicht wurde, weitgehend von der Affinität und Bindungskapazität der Insulinantikörper, sowie möglicherweise von den gleichen Charakteristiken der zellgebundenen Rezeptoren für Insulin und von der Abbaurate für Insulin abhängt.
- 2. - anzunehmen ist, daß die Serumspiegel des gebundenen Insulins wesentlich vom Ausmaß der Antikörperbildung determiniert werden.
- 3. - die Charakteristiken der gebildeten Antikörper einen Einfluß auf die Konzentrationshöhe des gebundenen Insulins haben könnten.
Kurtz et al. (128) fanden im Serum eines insulinbehandelten Diabetikers zwei verschiedene Dissoziationsraten gebundenen, markierten Insulins vor. Eine langsamere Dissoziationsrate mit der Halbwertszeit von t 1/2 = 182 min und eine schnellere mit der Halbwertszeit von t 1/2 = 5,5 min. Antikörperpopulationen mit einer überwiegend langsamen Dissoziationsrate gebundenen Insulins würden die Halbwertszeit des antikörpergebundenen Insulins im Blut erhöhen und damit zu einer Akkumulation des exogenen, wie des eventuell noch sezernierten Insulins führen.
Gleich unseren Ergebnissen wurde auch von anderen keine signifikante Korrelation zwischen der Insulindosis und den Insulinfraktionen im Serum angetroffen.

Vom freien, nicht an Insulinantikörper gebundenen Insulin wird zwar allgemein angenommen, daß es das für die Bindung an die Insulinrezeptoren zur Verfügung stehende und damit stoffwechselwirksame Insulin darstellt - Studien, in denen die Auswirkung der Serumspiegel des freien Insulins auf die Stoffwechseleinstellung von insulinbehandelten Diabetikern untersucht wurde, gibt es aufgrund der oben erörterten methodischen Schwierigkeiten jedoch bisher wenige (40 / 136). Die nicht signifikanten Korrelationen der vier verwendeten Parameter der Glucoseeinstellung MBG, MAGE,

M-value und Labilityindex mit der mittleren Konzentration des freien Insulin der 20 Diabetiker, sprachen gegen eine Auswirkung dieser Insulinfraktion auf die Diabeteseinstellung. Wegen der, bei den Patienten R.H., O.F. und C.B. zu vermutenden peripheren Insulinresistenz und dem Ausbleiben einer signifikanten Antikörperbildung beim Diabetiker B.G., scheint es jedoch sinnvoll, diese Patienten nicht in ein Kollektiv miteinzubeziehen, an dem die Beziehung zwischen dem freien, nicht an Antikörper gebundenen Insulin im Serum und der Diabeteseinstellung untersucht wird.

Die Ausklammerung der Werte dieser Patienten führte denn auch zu einem anderen Ergebnis: Ein Vergleich zwischen den 24^{h}-Profilen der Serumglucose und des freien Insulins der sieben Diabetiker mit C-Peptid und denen der neun Diabetiker ohne C-Peptid zeigte, daß die Diabetiker mit einem signifikant höheren freien Insulin, die Diabetiker mit C-Peptid, auch über eine bessere Glucoseeinstellung verfügten (s. Abb. 12). Das durchschnittliche freie Insulin der Gruppe mit einer residualen B-Zellfunktion war mit 38,5 $\pm$ 2,5 mE/l doppelt so hoch wie das der Gruppe ohne nachweisbare C-Peptidsekretion (17,8 $\pm$ 1 mE/l). Es war fast doppelt so hoch wie das, bei stoffwechselgesunden Probanden mit der PEG-Methode über den Tag bestimmte freie Insulin (40 / 124).
Es ist naheliegend, außer der besseren Glucoseeinstellung der sieben Diabetiker, auch deren höheres freies Insulin, der bei ihnen vorhandenen Insulinsekretion zuzuschreiben.
Ein signifikanter Anteil des endogenen Insulins am freien Insulin ist jedoch bei den meisten der sieben Diabetiker sehr wahrscheinlich nicht gegeben.
1. - es besteht zwischen dem durchschnittlichen freien Insulin und dem C-Peptid dieser Gruppe, keine signifikante positive Korrelation, d.h. eine relativ gute B-Zellrestfunktion geht nicht mit hohen Konzentrationen an freiem Insulin einher - und umgekehrt.
2. - gemäß den C-Peptidwerten der meisten der sieben Diabetiker ist deren B-Zellrestfunktion zu gering, um den Unterschied in der Höhe des freien Insulins, der zwischen ihnen und den neun Diabe-

tiker ohne C-Peptid besteht, bedingen zu können. Eine genaue Berechnung der Insulinkonzentrationen, die den gemessenen C-Peptidwerten entsprechen, ist allerdings nicht möglich. Wie bereits oben (s. Diskussion der Ergebnisse aus der Bestimmung des C-Peptides, Teil A, Methoden, S.84) erwähnt, zeigt das molare Verhältnis zwischen C-Peptid und Insulin bei fastenden, stoffwechselgesunden Probanden individuelle Unterschiede, die von einem Verhältnis von 1 : 4 bis 1 : 16 reichen (82). Darüberhinaus ändert sich das molare Verhältnis von Insulin zu C-Peptid in Abhängigkeit zum Sekretionsstatus der B-Zellen (23 / 25 / 137 / 138). 3. - zirkulierende Antikörper gegen das injizierte Insulin vermögen auch das sezernierte homologe Insulin zu binden. Es ist daher anzunehmen, daß nur ein Teil des sezernierten Insulins frei zirkuliert. Welcher prozentuale Anteil vom sezernierten Insulin letztlich an die Insulinantikörper gebunden wird, hängt von den Affinitätscharakteristika der Antikörper für humanes Insulin ab. Möglicherweise ist das höhere freie Insulin der Gruppe mit C-Peptid durch Unterschiede in den Charakteristiken der Antikörper bedingt. Wegen der kurzen Dauer ihrer Insulintherapie hatten die meisten der sieben Diabetiker mit C-Peptid Antikörper mit sehr niedrigen Bindungskapazitäten (s. Tab. 9). Kurtz et al. (128) zeigten, daß Patienten mit hohen Insulinbindungskapazitäten im allgemeinen niedrige Serumspiegel an freiem Insulin aufweisen. Somit könnten die meist niedrigen Insulinbindungskapazitäten der Antikörper der sieben Diabetiker, zum Teil ihr höheres freies Insulin erklären.

Es bleibt die Frage, wodurch die bessere Glucoseeinstellung der sieben Diabetiker bedingt ist. In der Diskussion der Ergebnisse aus der Bestimmung des C-Peptides wurde der günstige Einfluß, den eine residuale B-Zellfunktion auf die Glucoseeinstellung ausübt, ausführlich erörtert. Die Erklärung für den günstigen Einfluß einer oft minimalen B-Zellfunktion wurde nicht in den peripheren Insulinwirkungen, sondern in einer in diesem Fall noch teilweise intakten Interaktion zwischen A- und B-Zellen gesehen. Aufgrund der Beobachtungen einer anderen Studie und aufgrund theoretischer

Erwägungen, scheint es plausibel, daß neben der B-Zellrestfunktion auch die höheren Serumspiegel des freien Insulins einen signifikanten Beitrag zur besseren Glucoseeinstellung der sieben Diabetiker leisten.
- An einem umfangreichen Kollektiv beobachteten Asplin et al. (136) signifikante negative Korrelationen zwischen dem log freies Insulin und der Serumglucose, sowie den maximalen Amplituden beider Parameter. Eine Messung der residualen B-Zellfunktion hatten Asplin et al. leider nicht unternommen. Ihr Ergebnis unterstützt jedoch die Annahme, daß sich ein höheres freies Insulin günstig auf die Glucosehomöostase auswirkt.
- Bei Diabetikern ist die Konzentration des freien Insulins im peripheren Blut dieselbe wie in der Portalvene. Dagegen werden bei Nichtdiabetikern die Insulinkonzentrationen im Pfortaderblut durch die Sekretion des Pankreas aufrechterhalten und sind vor dem Insulinabbau in der Leber, dem Hauptorgan des Karbohydratmetabolismus, im Durchschnitt zwei- bis dreimal so hoch wie in der Peripherie (139 / 140). Um eine einigermaßen gute Glucoseeinstellung bewirken zu können, müßten sich demnach bei insulinbehandelten Diabetikern, eine vergleichbare Stoffwechselwirksamkeit vorausgesetzt, die Serumkonzentrationen des freien Insulins auf das Doppelte vom Normalen belaufen. Dies traf auf die Serumspiegel des freien Insulins der sieben Diabetiker mit hohem freien Insulin zu (s.o.).

All diese, in vorliegender und in anderen Studien (39 / 40 / 124) gemachten Beobachtungen lassen annehmen, daß das hier gemessene freie Insulin das biologisch aktive Insulin darstellt, auch wenn darüberhinaus andere Faktoren einen Einfluß auf die Diabeteseinstellung haben.

Ein gegenüber dem Normalen ums Doppelte erhöhter Serumspiegel des freien Insulins kann nicht ausreichen, um eine wirklich gute Diabeteseinstellung zu erzielen. Eine Anpassung an die Schwankungen der Blutglucose, d.h. eine weitgehende Nachahmung der physiologischen Sekretion ist zusätzlich nötig. Dieses Imitieren der nor-

malen Sekretion konnte bei zwei Patienten (I.F. und H.E.) in Form einer Korrelation zwischen den 24^h-Profilen des freien Insulins und des C-Peptides beobachtet werden. Beide Patienten zählten zu den am besten eingestellten Diabetikern dieser Studie (s. Tab. 3 und 4). Die Diabetikerin I.F. wies anscheinend nur noch eine minimale B-Zellrestfunktion auf. Ein signifikanter Anteil des endogen sezernierten Insulins am freien Insulin war daher nur beim Patienten H.E. wahrscheinlich, der mit 0,33 pmol/ml eine beträchtliche C-Peptidsekretion bei einem mit 30 mE/l nur mäßig hohen freien Insulin zeigte.
Ein ebenfalls dem Verlauf der endogenen Sekretion ähnelndes Profil des freien Insulins, wiesen die sehr gut eingestellten schwangeren Diabetikerinnen der Studie von Lewis et al. (40) auf. Darüberhinaus entsprach deren durchschnittliche Serumkonzentration an freiem Insulin mit ca. 40 mE/l, dem freien Insulin der sieben in guter metabolischer Kontrolle befindlichen Diabetiker der vorliegenden Arbeit. Die Autoren erklärten sich ihre erfreulichen Befunde als Folge einer, den eingenommenen vier Mahlzeiten optimal angepaßten Insulintherapie. Von anderen Arbeitsgruppen, die sich in "research wards" um eine optimale Diabeteseinstellung mit der herkömmlichen Insulintherapie bemühten, wurden derartige Erfolge nicht berichtet (54 / 55 / 141). Die Glucoseeinstellung ihrer Patienten entsprach eher der Verteilung an gut und schlecht eingestellten Diabetikern, wie sie in der vorliegenden Arbeit angetroffen wurde. Weiterhin scheint eine Nachahmung der physiologischen Sekretion vermittels subkutaner Insulingaben nur in Ausnahmefällen möglich zu sein. Gründe hierfür sind vor allem in den Absorptionsraten des subkutan injizierten Insulins zu sehen, die sich von Injektion zu Injektion drastisch ändern können (s.o. u. 131).

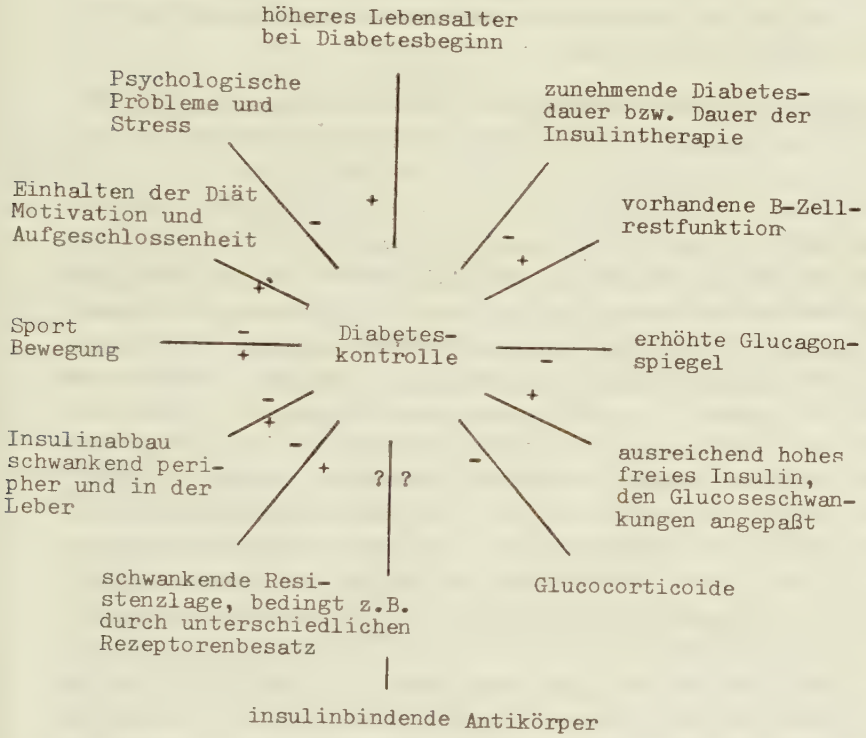
Insulinantikörper sind nicht zuletzt im Zusammenhang mit der Entwicklung und Einführung von hochgereinigten, möglicherweise weniger antigenen Insulinen von besonderem Interesse für die Diabetestherapie (52 / 142). Während unbestritten ist, daß insulinbindende Antikörper am seltenen (ca. 0,1 % der insulinbehandelten Diabe-

tiker) Phänomen einer Insulinresistenz mitbeteiligt sein können (130), ist ihr Einfluß auf die Diabeteskontrolle unklar und wird von verschiedenen Arbeitsgruppen kontrovers beurteilt (s. Einleitung). In der vorliegenden Studie erreichten die Korrelationen des durchschnittlichen antikörpergebundenen Insulins, sowie der Affinitätscharakteristika der Insulinantikörper mit den Parametern der Glucoseeinstellung, keine Signifikanz. Dieses Ergebnis entspricht den zahlreichen Studien, in denen keine unmittelbare Auswirkung der Insulinantikörper auf die metabolische Kontrolle beobachtet wurde (48 / 49 / 50 / 51 / 52 / 53). Neben anderen Faktoren wird die Serumkonzentration des freien Insulins auch von den Affinitätscharakteristika der insulinbindenden Antikörper beeinflußt (s. Teil A: Methoden). Eine Auswirkung von Insulinantikörpern auf die Stoffwechselkontrolle könnte sich daher auch mittelbar manifestieren, indem sie das Erreichen von therapeutisch sinnvollen Konzentrationen an stoffwechselwirksamem freien Insulin erschweren oder gar verhindern. Einen Anhalt für diese Annahme geben die oben erwähnte Studie von Kurtz et al. (s. S. 103) und die Ergebnisse vorliegender Arbeit. Niedrige Bindungskapazitäten der insulinbindenden Antikörper gingen mit höherer Serumkonzentrationen an freiem Insulin einher - und umgekehrt. Weiterhin würde sich ein Einfluß der Affinitätscharakteristika auf die Stoffwechselkontrolle möglicherweise nicht unmittelbar im Verhältnis des gebundenen Insulins und der Affinitätscharakteristika zur Diabeteskontrolle widerspiegeln, sondern könnte subtiler, z.B. in der Verteilung der "low" und "high affinity sites" der Insulinantikörper begründet sein.

Abschließend sind in der Abbildung 13 die zahlreichen, teils ineinandergreifenden Faktoren, die sich auf die Stoffwechselkontrolle des insulinbehandelten Diabetikers auswirken, aufgeführt - soweit sie bisher bekannt sind, oder sich aus den Befunden dieser Studie ergeben.

Abbildung 13

Faktoren, die die metabolische Kontrolle bei insulinabhängigen Diabetikern beeinflußen können



4. Diskussion der Ergebnisse aus der Bestimmung des Laktats, Alanins und der freien Fettsäuren

Die drei oben genannten Metabolite wurden anhand der Gruppe der 16 Patienten (Kollektiv der Diabetiker vom juvenilen Typ ohne O.F., R.H., C.B. und B.G.) ausgewertet, da nur bei dieser ein Vergleich mit dem Serumspiegel des freien Insulins und des Verhältnisses g/f möglich war.

Im Gegensatz zum Verlauf der Serumglucose korrelierten die 24^h-Profile des Laktats und des Alanins signifikant mit den Serumkonzentrationen des freien Insulins und des Verhältnisses g/f (s. Tab. 11 und Abb. 9). Alberti et al. (6) beobachteten bei den von ihnen untersuchten insulinbehandelten Diabetikern ein vergleichbares 24^h-Profil des Laktats und diskutierten den morgendlichen Laktatanstieg als eine Folge des schnellen Glucosekatabolismus in Gegenwart von pharmakologischen Insulinspiegeln. Eine andere Möglichkeit, die ebenso in Betracht zu ziehen ist, wäre die Hemmung der Pyruvatutilisation durch freie Fettsäuren (143). Der nächtliche Abfall des Laktats der 16 Diabetiker, bei einem zeitlich parallelen Anstieg der freien Fettsäuren, könnte Ausdruck einer derartigen Inhibition sein (s. Abb. 9). Der 24^h-Verlauf des Alanins der Gruppe glich dem des Laktats und war dem Tagesprofil des Alanins ähnlich, das von anderen (6) vorgefunden wurde. Die Ähnlichkeit der Laktat- und Alaninprofile mag durch das sich rasch einstellende Äquilibrium zwischen Laktat, Pyruvat und Alanin bedingt sein. Das Äquilibrium zwischen diesen Metaboliten wird über eine Transaminierung (144) und die Verbindung des Cori-Zyklus mit dem Glucose-Alanin Zyklus (145) ermöglicht. Es wurde gezeigt, daß Insulin die zirkulierenden Alaninspiegel zu erhöhen vermag. Dies kann sowohl über eine erhöhte intrazelluläre Produktionsrate als auch über eine Hemmung der Gluconeogenese aus Alanin geschehen (Übersicht bei 146). Dem entspräche, daß bei den 16 Patienten dieser Studie der Alaninspiegel höchstsignifikant mit den Serumkonzentrationen des freien Insulins korrelierte (s. Tab. 11 und Abb. 9).

Literaturverzeichnis

1 Nabarro, J.D.N., Mustaffa, B.E., Morris, D.V., Walport, M.J. & Kurtz, A.B. (1979)
Insulin deficient diabetes (Contrasts with other endocrine deficiencies).
Diabetologia 16, 5-12

2 Mehnert, H. (1974)
Zur Pathogenese und Prophylaxe der diabetischen Mikroangiopathie.
Dtsch. Med. Wschr. 99, 2418

3 Standl, A. (1978)
Diabetische Mikroangiopathie: Neuere Konzepte zur Pathogenese.
Dtsch. Med. Wschr. 20, 841-844

4 Knowles, H.C. (1970)
Control of diabetes and the progression of vascular disease
In: "Diabetes mellitus: theory and practice" Ellenberg, M. & Rifkin, H., New York, USA, 666

5 Cahill, G.F., Erzwiler, D.D. & Freinkel, N. (1976)
"Control" and diabetes.
New. Engl. J. Med. 294, 1004

6 Alberti, K.G.M.M., Dornhorst, A. & Rowe, A.S. (1975)
Metabolic rhythms in normal and diabetic man. Studies in insulin-treated diabetics.
Jsr J Med Sci 2, 571-580

7 Siess, E.A., Näthke, H.E., Dexel, T., Haslbeck, M., Mehnert, H. & Wieland, O.H. (1979)
Dependency of muscle capillary basement membrane thickness on the duration of diabetes.
Diabetes Care 2, 472-478

8 Haupt, E. & Beyer, J. (1974)
Gefäßkrankheiten bei Diabetes Mellitus.
In: Mehnert, H., Schöffling, K. (Hrsg.): Diabetologie in Klinik und Praxis (Thieme: Stuttgart 1974), 357

9 Balodimos, M.C. (1971)
Diabetic nephropathy
In: Marble, A., White, P., Bradley, R.F., Krall, L.P. (Hrsg.):
Joslin's Diabetes mellitus (Lea & Febiger: Philadelphia 1971), 52

10 Palmberg, P.F. (1977)
Diabetic retinopathy
Diabetes 26, 703

11 Mauer, S.M., Barbosa, J., Vernier, R.L., Kjellstrand, C.M., Buselmeier, T.J., Simmons, R.L., Najarian, J.S. & Goetz, F.C. (1976)
Development of diabetic vascular lesion in normal kidneys transplanted into patients with diabetes mellitus.
New Engl. J. Med. 295, 916

12 Mauer, S.M., Sutherland, D.E.R., Steffes, M.W., Leonard, P.J., Najarian, J.S., Michael, A.F. & Brown, D.M. (1974)
Pancreatic islet transplantation. Effects on the glomerular lesion of experimental diabetes in the rat.
Diabetes 23, 748

13 Mauer, S.M., Steffes, M.W., Sutherland, D.E.R., Najarian, J.S., Michael, A.F. & Brown, D.M. (1975)
Studies of the rate of regression of the glomerular lesions in diabetic rats treated with pancreatic islet transplantation.
Diabetes 24, 280

14 Federlin, K., Bretzel, R.G. & Schmidtchen, U. (1976)
Islet transplantation in experimental diabetes of the rat.
V. Regression of glomerular lesions in diabetic rats after intra portal transplantation of isogeneic islets. Preliminary results.
Horm. Metab. Res. 8, 404

15 Gray, B.N. & Watkins, E., Jr. (1976)
Prevention of vascular complications of diabetes by pancreatic islet transplantation.
Arch. Surg. 111, 254

16 Rasch, R. (1979)
Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats by insulin treatment.
Diabetologia 16, 319-324

17 Berson, S.A., Yalow, R.S., Baumann, A., Rothschild, M.A. & Newerly, K. (1956)
Insulin-J^{131} metabolism in human subjects: Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects.
J. Clin. Invest. 35, 170-190

18 Andersen, O.O. (1976)
Anti-insulin-antibodies and late diabetic complications.
Acta Endocrin. 83, 329-340

19 Gerbitz, K.-D. & Kemmler, W. (1978)
Method for rapid quantitation and characterization of insulin antibodies.
Clin. Chem. 24, 890-894

20 Steiner, D.F. & Oyer, P.E. (1967)
The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57, 473-480

21 Kemmler, W., Steiner, D.F. & Borg, J. (1973)
Studies on the conversion of proinsulin to insulin. III. Studies in vitro with a crude secretion granule fraction isolated from rat islets of Langerhans.
J. Biol. Chem. 248, 4544-4551

22 Rubenstein, A.H., Steiner, D.F., Horwitz, D.L., Mako, M.E., Block, M.B., Starr, J.I., Kuzuya, H. & Melani, F. (1977)
Clinical significance of circulating proinsulin and C-peptide.
Rec. Progr. Horm. Res. 33, 435-468

23 Horwitz, D.L., Starr, J.I., Mako, M.E., Blackard, W.G. & Rubenstein, A.H. (1975)
Proinsulin, insulin and C-peptide concentrations in human portal and peripheral blood.
J. Clin. Invest. 55, 1278-1283

24 Beischer, W., Heinze, E., Keller, L., Raptis, S., Kerner, W. & Pfeiffer, E.F. (1976)
Human C-peptide, part II: Clinical studies.
Klin. Wschr. 54, 717-725

25 Faber, O.K., Kehlet, H., Madsbad, S. & Binder, C. (1978)
Kinetics of human C-peptide in man.
Diabetes 27, Suppl. 1, 207-209

26 Block, M.B., Mako, M.E., Steiner, D.F. & Rubenstein, A.H. (1972)
Circulating C-peptide immunoreactivity. Studies in normal and diabetic subjects.
Diabetes 21, 1013-1026

27 Heding, L.G. (1975)
Radioimmunological determination of human C-peptide in serum.
Diabetologia 11, 541-548

28 Beischer, W., Raptis, S., Keller, L., Heinze, E., Schröder, K.E. & Pfeiffer, E.F. (1975)
Characterization of the residual beta-cell function in diabetics by a new C-peptide radioimmunoassay.
11 th Annu. Meet. Eur. Assoc. Study Diabetes, München.
Diabetologia 11, 332, Abstract.

29 Reynolds, C., Molnar, G.D., Horwitz, D.L., Rubenstein, A.H., Taylor, W.F. & Nai-Sang (1977)
Abnormalties of endogenous glucagon and insulin in unstable diabetes.
Diabetes 26, 36-45

30 Yue, D.K., Baxter, R.C. & Turtle, J.R. (1978)
C-peptide secretion and insulin antibodies as determinants of stability in diabetes mellitus.
Metabolism 27, 35-44

31 Shima, K., Tanaka, R., Morishita, S., Tarui, S., Kumahara, Y. & Nishikawa, M. (1977)
Studies on the etiology of "brittle diabetes". Relationship between diabetic instability and insulinogenic reserve.
Diabetes 26, 717-725

32 Grajwer, L.A., Pildes, R.S., Horwitz, D.L. & Rubenstein, A.H. (1977)
Control of juvenile diabetes mellitus and its relationship to endogenous insulin secretion as measured by C-peptide immunoreactivity.
J. Pediatr. 90, 42-48

33 Heinze, E., Beischer, W., Keller, L., Winkler, G., Teller, W.M. & Pfeiffer, E.F. (1978)
C-peptide secretion during the remission phase of juvenile diabetes.
Diabetes 27, 670-676

34 Ludvigsson, J. & Heding, L.G. (1977)
C-peptide in diabetic children after stimulation with glucagon compared with fasting C-peptide levels in non-diabetic children.
Acta Endocrinol. 85, 364-371

35 Hendriksen, C., Faber, O.K., Drejer, J. & Binder, C. (1977)
Prevalence of residual beta-cell function in insulin-treated diabetics evaluated by the plasma C-peptide response to intravenous glucagon.
Diabetologia 13, 615-619

36 Ludvigsson, J. & Heding, L.G. (1978)
Beta-cell function in children with diabetes.
Diabetes 27, Suppl. 1, 230-234

37 Desbuquois, S. & Auerbach, G.D. (1971)
Use of polyethylen glycol to separate free and antibody bound peptide hormones in radioimmunoassays.
J. Clin. Endocrinol. 33, 732-738

38 Nakagawa, S., Nakayama, H., Sasaki, T., Yoshino, K., Yune Ying Yu Shinozaki, K., Aoki, S. & Mashimo, K. (1973)
A simple method for the determination of serum free insulin levels in insulin-treated patients.
Daibetes 22, 590-600

39 Kuzuya, H., Blix, P.M., Horwitz, D.L., Steiner, D.F. & Rubenstein, A.H. (1977)
Determination of free and total insulin and C-peptide in insulin-treated diabetics.
Diabetes 26, 22-29

40 Lewis, S.B., Wallin, J.D., Kuzuya, H., Murray, W.K., Coustan, D.R., Daane, T.A. & Rubenstein, A.H. (1976)
Circadian variation of serum glucose, C-peptide immunoreactivity and free insulin in normal and insulin-treated diabetic pregnant subjects.
Diabetologia 12, 343-350

41 Dixon, K., Exon, P.D. & Hughes, H.R. (1972)
Insulin antibodies in the etiology of labile diabetes.
Lancet 1, 343-347

42 Dixon, K. (1974)
Measurement of antibodies to insulin in serum.
Clin. Chem. 20, 1275-1280

43 Jackson, P.A. & Dixon, K. (1977)
Preparation of human antibodies to insulin.
J. Immunolog. Meth. 1, 201-211

44 Dixon, K., Exon, P.D. & Malins, J.M. (1975)
Insulin antibodies and the control of diabetes.
Q. J. Med. 44, 543-553

45 Sebriakowa, M. & Little, J.A. (1973)
A method for the determination of plasma insulin antibodies and its application in normal and diabetic subjects.
Diabetes 22, 30-40

46 Little, J.A., Lee, R., Sebriakowa, M. & Csima, A. (1977)
Insulin antibodies and clinical complications in diabetics treated for five years with lente or sulfated insulin.
Diabetes 26, 980-988

47 Czyzyk, A., Lawecki, J., Rogala, H., Miedzinska, E. & Popikhonkiewicz, A. (1974)
Serum levels of insulin-binding antibodies in diabetic patients treated with monocomponent insulin.
Diabetologia 10, 233-236

48 Asplin, C.M., Hartog, M., Goldie, D.J., Alberti, K.G.M.M., Smythe, P., Binder, C. & Faber, O.K. (1978)
A comparision between diabetics receiving a high or low daily insulin dosage.
Horm. Metab. Res. 10, 365-369

49 Asplin. C.M., Hartog, M. & Goldie, D.J. (1978)
Change of insulin dosage, circulating free and bound insulin and insulin antibodies on transferring diabetics from conventional to highly purified porcine insulin.
Diabetologia 14, 99-105

50 Yue, D.K., Baxter, R.C. & Turtle, J.R. (1976)
The dissociation of insulin from human insulin antibodies.
Biochem. Biophys. Acta 444, 231-239

51 Baxter, R.C., Yue, D.K. & Turtle, J.R. (1976)
Equilibrium binding studies of insulin antibodies in diabetic subjects.
Clin. Chem. 22, 1089-94

52 Yue, D.K. & Turtle, J.R. (1977)
New forms of insulin and their use in the treatment of diabetes.
Diabetes 26, 341-345

53 Tantillo, J.J., Karam, J.H., Burik, K.C., Jones, M.A., Grodsky, G.M. & Forsham, P.H. (1974)
Immunogenicity of "single peak" beef-pork insulin in diabetic subjects.
Diabetes 23, 276-281

54 Service, F.J., Molnar, G.D., Rosevear, J.W., Ackermann, E., Gatewood, L.C. & Taylor, W.F. (1970)
Mean amplitude of glycemic excursions, a measure of diabetic instability.
Diabetes 19, 644-655

55 Molnar, G.D., Gastineau, C.F., Rosevear, J.W. & Moxness, K.E. (1965)
Quantitative aspects of labile diabetes.
Diabetes 14, 279-288

56 Schlichtkrull, J., Munck, O. & Jersild, M. (1965)
The M-value, an index of blood-sugar control in diabetics.
Acta. Med. Scand. 177, 95-102

57 Naithani, V.K., Dechesne, M., Markussen, J. & Heding, L.G. (1975)
Improved synthesis of human proinsulin C-peptide and its benzyloxycarbonyl derivative. Circular dichroism and immunological studies of human C-peptide.
Hoppe-Seyler's Z. Physil. Chem. 356, 997-1010

58 Naithani, V.K., Dechesne, M., Markussen, J., Heding, L.G. & Larsen, U.D. (1975)
Synthesis, circular dichroism and immunological studies of tyrosyl C-peptide of human proinsulin.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1305-1312

59 Faber, O.K., Markussen, J., Naithani, V.K. & Binder, C. (1976)
Systematic production of antisera to synthetic benzyloxycarbonyl C-peptide of human proinsulin.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 751-757

60 Faber, O.K., Binder, C., Markussen, J., Heding, L.G., Naithani, V.K., Kuzuya, H., Blix, P., Horwitz, D.L. & Rubenstein, A.H. (1978)
Characterization of seven C-peptide antisera.
Diabetes 27, Suppl. 1, 170-177

61 Gerbitz, K.-D. (1980)
Pankreatische B-Zellenpeptide. Kinetik und Konzentration von Proinsulin, Insulin und C-Peptid in Plasma und Urin, Probleme der Meßmethoden, klinische Aussage und Literaturübersicht.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18, 313-326

62 Kolb, H.J. & Standl, E. (1975)
The influence of insulin degradation on the radioimmunoassay of insulin.
Proc. IX. Annu. Meeting Eur. Soc. Clin. Invest., Rotterdam 1975, Abstract p. 55

63 Scatchard, G., Coleman, J.S. & Shen, A.L. (1957)
Physical chemistry of protein solutions. VII. The binding of some small anions to serum albumin.
J. Amer. chem. Soc. 79, 12

64 Berson, S.A. & Yalow, R.S. (1959)
Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody.
J. Clin. Invest. 38, 1996

65 Kerp, L., Steinhilber, S. & Kasemir, H. (1966)
Ein Verfahren zum Nachweis insulinbindender Antikörper durch Differentialadsorption.
Klin. Wschr. 44, 560-567

66 Hunston, D.L. (1975)
Two techniques for evaluating small molecular-macromolecule binding in complex systems.
Anal. Biochem. 63, 99

67 Dolhofer R., Weiss, L. & Wieland, O.H. (1976)
Erfahrungen mit der Glucose-Dehydrogenase-UV-Methode zur Bestimmung der Blutglucose.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 14, 415-417

68 Williamson, D.H., Lopes-Vieira, O. & Walker, B. (1967)
Concentrations of free glucogenic acids in liver of rats subjected to various metabolic stresses.
Biochem. J. 104, 497-502

69 Duncombe, W. (1963)
The colorimetric microdetermination of long-chain fatty acids.
Biochem. J. 88, 7

70 Fajans, S.S., Cloutier, M.C., Crowther, R.L. & Arbor, A. (1978)
Clinical and etiologic heterogeneity of idiopathic diabetes mellitus.
Diabetes 27, 1112-1125

71 West, K.M. (1979)
Standardization of definition, classification, and reporting in diabetes-related epidemiologic studies.
Diabetes Care 2, 65-76

72 Tattersall, R. & Pyke, D.A. (1972)
Diabetes in identical twins.
Lancet 2, 1120-1125

73 Singal, D.P. & Blajchman, M.A. (1973)
Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus.
Diabetes 22, 429-432

74 Nerup, J., Platz, P., Andersen, O.O., Christy, M., Lyngsøe, J., Poulsen, J.E., Ryder, L.P., Thomsen, M., Staub Nielsen, L. & Svejgaard, A. (1974)
HL-A antigens and diabetes mellitus.
Lancet 2, 864-866

75 Nerup, J., Andersen, O.O., Christy, M., Platz, P., Ryder, L., Thomsen, M. & Svejgaard, A. (1976)
HLA autoimmunity, virus and the pathogenesis of juvenile diabetes mellitus.
Acta Endocrinol. Suppl. 205, 167-175

76 Cudworth, A.G. & Woodrow, J.C. (1976)
Genetic susceptibility in diabetes mellitus: Analysis of the HLA association.
Br. Med. J. 2, 846-848

77 Nerup, J., Platz, P., Ryder, L.P., Thomsen, M. & Svejgaard, A. (1978)
HLA, islet cell antibodies, and types of diabetes mellitus.
Diabetes 27, Suppl. 1, 247-250

78 Fajans, S.S. (1978)
Diabetes mellitus.
In The Year in Metabolism 1967 - 1977. Freinkel, N., Editor.
Chapter 2. New York, Plenum Publishing, 1978, pp. 33-99

79 Rotter, J.I. & Rimoin, D.L. (1978)
Heterogeneity in diabetes mellitus - Update, 1978. Evidence for further genetic heterogeneity within juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus.
Diabetes 27, 599-605

80 Renschler, H. (1964)
Der Einfluß der Nierenfunktion auf die Glucose-Ausscheidung Gesunder.
Habil.-Schrift, Heidelberg 1964.

81 Mohnike, G. (1967)
Diabetes mellitus.
In: Handbuch der praktischen Geriatrie, Bd. 2, 507-527.
Enke, Stuttgart 1967.

82 Heding, L.G. & Rasmussen, M. (1978)
Insulin, C-peptide and proinsulin in nondiabetics and insulin-treated diabetics.
Diabetes 27 (Suppl. 1), 178-183

83 Fink, G., Cresto, J.C., Gutman, R.A., Lavine, R.L., Rubenstein, A.H. & Recant, L. (1974)
Plasma proinsulin-like material in insulin-treated diabetics.
Horm. Metab. Res. 6, 439-443

84 Heding, L.G. (1977)
Specific and direct radioimmunoassay for human proinsulin in serum.
Diabetologia 13, 467-474

85 Kuzuya, H., Blix, P.M., Horwitz, D.L., Rubenstein, A.H., Steiner, D.F., Binder, C. & Faber, O.K. (1977)
Heterogeneity of circulating C-peptide.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 44, 952-962

86 Kuzuya, H., Blix, P.M., Horwitz, D.L., Rubenstein, A.H. & Steiner, D.F. (1978)
Heterogeneity of circulating C-peptide: Human C-peptide radioimmunoassay with three different antisera.
Diabetes 27 (Suppl. 1), 184-191

87 Heding, L.G., Larsen, U.D., Markussen, J., Jørgensen, K.H. & Hallund, O. (1974)
Radioimmunoassays for human, pork and ox C-peptides and related substances.
Horm. Metab. Res. 5, (Suppl.), 40-44

88 Ludvigsson, J. & Heding, L.G. (1976)
C-peptide in children with juvenile diabetes. A preliminary report.
Diabetologia 12, 627-630

89 Madsbad, S., Mc Nair, P., Christiansen, P., Faber, O., Transbøl, I. & Binder, C. (1978)
Prevalence of residual B-cell function in insulin-dependent diabetics in relation to age at onset and duration of diabetes.
Diabetes 27 (Suppl. 1), 260-262

90 Gepts, W. & De Mey, J. (1978)
Islet cell survival determined by morphology.
Diabetes 27 (Suppl. 1), 251-261

91 Mirouze, J., Selam, J.L., Pham, T.C., Mendoza, E. & Orsetti, A. (1977)
Remission of juvenile diabetes with severe insulin deficiency induced by early transient insulin therapy assessed by the artificial beta cell.
13 th Annu. Meet. Eur. Assoc. Study Diabetes, Geneva.
Diabetologia 13, 419, Abstr.

92 Turner, R.C., Holman, R.R. & Harris, E. (1977)
Beta cell recovery with a regular meal/insulin infusion regime in new, severe, ketotic diabetics.
13 th Annu. Meet. Eur. Assoc. Study Diabetes, Geneva.
Diabetologia 13, 437, Abstr.

93 Heding, L.G. & Rasmussen Munkgaard, S. (1975)
Human C-peptide in normal and diabetic subjects.
Diabetologia 11, 201-206

94 Grodsky, G.M., Feldman, R., Toreson, W.E. & Lee, J.C. (1966)
Diabetes mellitus in rabbits immunized with insulin.
Diabetes 15, 579-585

95 Hahn, H.J., Menzel, R., Gottschling, H.D. & Jahr, D. (1976)
Enhancement of glucose-stimulated insulin secretion from isolated rat pancreatic islets by human insulin antibodies.
Acta Endocrinol. Copenhagen 83, 123-132

96 Ziegler, M., Hahn, H.J. & Klatt, D. (1972)
Influence of isolated insulin antibodies on the insulin secretion of the islets of Langerhans in vitro.
Diabetologia 8, 148-149

97 Faber, O.K. & Binder, C. (1977)
Beta-cell function and blood glucose control in insulin dependent diabetics within the first month of insulin treatment.
Diabetologia 13, 263-268

98 Beischer, W., Kerner, W., Raptis, S., Keller, L., Beischer, B. & Pfeiffer, E.F. (1978)
Insulin therapy on relation to circulating C-peptide levels.
Diabetes 27, (Suppl. 1) 235-240

99 Malaisse, W.J. (1972)
Hormonal and environmental modification of islet activity.
In: Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology. Eds.: Steiner, D.F., Freinkel, N., American Physioligical Society, Washington, D.C. - p. 237-260

100 Faber, O.K. & Binder, C. (1977)
Plasma C-peptide during the first year of insulin-dependent diabetes mellitus.
Proc. IX th IDF Congr., New Dehli, 1976.
Amsterdam Excerpta Medica 1977

101 Ludvigsson, J. & Heding, L.G. (1977)
C-peptide in diabetic children after stimulation with glucagon compared with fasting C-peptide levels in non-diabetic children.
Acta Endocrinol. 85, 364-371

102 Bishop, J.S. & Larner, J. (1967)
Rapid activation-inactivation of liver uridine diphosphate glucose glycogen transferase and phosphorylase by insulin and glucagon in vivo.
J. biol. Chem. 242, 1354

103 Menahan, L.A. & Wieland, O. (1969)
Interactions of glucagon and insulin on the metabolism of perfused rat liver with particular reference to gluconeogenesis.
Europ. J. Biochem. 10, 188

104 Orci, L., Unger, R.H. & Renold, A.E. (1973)
Structural coupling between pancreatic islet cells.
Experentia 29, 1015-1018

105 Orci, L., Malaisse-Lagae, F., Ravazzola, M., Rouiller, C., Renold, A.E., Perrelet, A. & Unger, R.H. (1975)
A morphological basis for intercellular communication between A- and B-cells in the endocrine pancreas.
J. Clin. Invest. 56, 1066-1070

106 Liljenquist, J.E., Horwitz, D.L., Jennings, A.S., Chiasson, J-L, Keller, U. & Rubenstein, A.H. (1978)
Inhibition of insulin secretion by exogenous insulin in normal man as demonstrated by C-peptide assay.
Diabetes 27, 563-570

107 Samols, E. & Harrison, J. (1976)
Intra-islet negative insulin-glucagon feed-back.
Metabolism 25 (Suppl. 1), 1443-1447

108 Samols, E., Tyler, J.M. & Marks, V. (1972)
In Glucagon. Molecular physiology, clinical and therapeutic implications.
ed. P.J. Lefebre, R.H. Unger, p. 151. Amsterdam: Pergamon. 370 pp

109 Patton, G., Vale, W., Dobbs, R., Orci, L. & Unger, R.H. (1976)
Stimulation of pancreatic immunoreactive somatostatin (IRS) release by glucagon.
Metabolism 25 (Suppl. 1), 1449

110 Alberti, K.G.M.M., Christensen, N.J., Christensen, S.E., Hansen, A.P., Iversen, J., Lundbaek, K., Seyer-Hansen, K. & Orskov, H. (1973)
Inhibition of insulin secretion by somatostatin.
Lancet 2, 1299-1301

111 Koerker, D.J., Ruch, W., Chideckel, E., Palmer, J., Goodner, C.J., Ensinck, J. & Gale, C.C. (1974)
Somatostatin: Hypothalamic inhibitor of the endocrine pancreas.
Science 184, 482-483

112 Unger, R.H. & Orci, L. (1977)
The role of glucagon in the endogenous hyperglycemia of diabetes mellitus.
Ann. Rev. Med. 28, 119-130

113 Unger, R.H. & Orci, L. (1975)
The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus.
Lancet 1, 14-16

114 Gerich, J.E., Lorenzi, M., Bier, D.M., Schneider, V., Tsalikian, E., Karam, J.H. & Forsham, P.H. (1975)
Prevention of human diabetic ketoacidosis by somatostatin.
Evidence for an essential role of glucagon.
N. Engl. J. Med. 292, 985-989

115 Mc Garry, J.D., Wright, P. & Foster, D. (1975)
Hormonal control of ketogenesis: Rapid activation of hepatic ketogenic capacity in fed rats by anti-insulin serum and glucagon.
J. Clin. Invest. 55, 1202-1209

116 Gerich, J.E., Langlois, M., Noacco, C., Karam, J.H. & Forsham, P.H. (1973)
Lack of glucagon response to hypoglycemia in diabetes:
Evidence for an intrinsic pancreatic alpha-cell defect.
Science 182, 171-173

117 Bloom, S.R., Adrian, T.E., Mitchell, S.J., Barnes, A.J. & Kohner, E.M. (1976)
Dirty insulin: a stimulant autoimmunity.
Diabetologia 12, 381-385

118 Andersen, O.O. (1976)
Clinical significance of anti-insulin-antibodies.
Acta endocrinologica 83 (Suppl. 205), 231-238

119 Devlin, J.C. (1966)
Evidence for the existence of an IgM immunoglobulin to insulin.
Irish J. Med. Sci. 6, 507

120 Reisman, R.E., Dolovich, J., Schnatz, J.D., Yagi, Y. & Arbesman, C.E. (1969)
Immunologic studies of insulin allergy and resistance
J. Allergy 43, 169

121 Dolovich,J., Schnatz, J.D., Reisman, R.E., Yagi, Y. & Arbesman, C.E. (1970)
Insulin allergy and insulin resistance. Case report with immunologic studies.
J. Allergy 46, 127

122 Andersen, O.O. (1977)
The clinical significance of insulin antibodies.
Acta Paediatr. Scand. (Suppl. 270), 63-66

123 Følling, J. (1976)
Insulin-anti-insulin complexes.
Acta endocrinologica 83, (Suppl. 205), 199-207

124 Gennaro, W.D. & Van Norman, J.D. (1975)
Quantitation of free, total, and antibody-bound insulin in insulin-treated diabetics.
Clin. Chem. 21, 873-879

125 Berson, S.A. & Yalow, R.S. (1962)
Immunoassay of plasma insulin.
Ciba Coll. Endocrinol. 41, 182

126 Heding, L.G. (1969)
Determination of free and antibody-bound insulin in insulin-treated diabetic patients.
Horm. Metab. Res. 1, 145

127 Iverius, P.H. & Laurent, T.C. (1967)
Precipitation of some plasma proteins by addition of dextran or polyethylene glycol.
Biochim. Biophys. Acta 331, 371

128 Kurtz, A.B., Mustaffa, B.E., Daggett, P.R. & Nabarro, J.D.N. (1977)
Effect of insulin antibodies on free and total plasma insulin.
Lancet 9, 56-58

129 Olefsky, J.M. & Reaven, G.M. (1977)
Insulin binding in diabetes. Relationship with plasma insulin levels and insulin sensitivity.
Diabetes 26, 680-688

130 Kerp, L., Henrichs, H.R. & Kasemir, H. (1976)
Insulin-binding antibodies of serum and insulin resistance.
In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, XXXII/2 Insulin, Herausgeber: Bom, G.V.R., Eichler, O., Farah, A., Herken, H., Welch, A.D. - p. 595-633

131 Lauritzen, T., Faber, O.K. & Binder, C. (1979)
Variation in ^{125}J-Insulin absorption and blood glucose concentration.
Diabetologia 17, 291-295

132 Zeleznik, A.J. & Roth, J. (1978)
Demonstration of the insulin receptor in vivo in rabbits and its possible role as a reservoir for the plasma hormone.
J. Clin. Endocr. Metab. 38, 305-308

133 Schlichtkrull, J.S. (1977)
The absorption of insulin.
Acta Paediatr. Scand. Suppl. 270, 97-101

134 Gerbitz, K.-D., Kemmler, W., Edelmann, E., Hepp, K.D. & Renner, R. (1979)
Bedeutung der C-Peptidbestimmung als Parameter der B-Zellfunktion bei insulinbehandelten Diabetikern unter herkömmlicher und programmierter Insulinzufuhr.
C-Peptid-Symposium, Düsseldorf, in press.

135 Yalow, R.S. (1976)
Application of radioimmunological methods to problems in insulin antigenicity and hormonal assay.
In "Insulin" (R. Luft, ed.) 149-196. A. Lindgreen & Söner, A.E. Mölndal, Sweden

136 Asplin, C.M., Artog, M. & Goldie, D.J. (1978)
The relationship between circulating free and bound insulin, insulin antibodies, insulin dosage and diabetic control in insulin-treated diabetics.
Acta Endocr. 87, 330-338

137 Sherwin, R.S., Kramer, K.J., Tobin, J.D., Insel, P.A., Lieljenquist, J.E., Berman, M. & Andres, R. (1974)
A model of the kinetics of insulin in man.
J. Clin. Invest. 53, 1481-1492

138 Kühl, C., Faber, O.K., Hornnes, P. & Jensen, S.L. (1978)
C-peptide metabolism and the liver.
Diabetes 27, (Suppl. 1), 197-200

139 Cerasi, E., Hallberg, D. & Luft, R. (1970)
Simultaneous determination of insulin in brachial and portal veins during glucose infusion in normal and prediabetic subjects.
Horm. Metab. Res. 2, 303-304

140 Blackard, W.G. & Nelson, N.C. (1970)
Portal and peripheral vein immunoreactive insulin concentrations before and after glucose infusion.
Diabetes 19, 302-306

141 Molnar, G.D. (1978)
Clinical evaluation of metabolic control in diabetes.
Diabetes 27, (Suppl. 1), 216-225

142 Alberti, K.G.M.M. & Nattrass, M. (1978)
Highly purified insulins.
Diabetologia 15, 77-80

143 Garland, P.B., Newsholme, E.A. & Randle, P.J. (1964)
Regulation of glucose uptake by muscle. 9. Effects of fatty acids and ketone bodies and diabetes and starvation on pyruvate metabolism and lactate to pyruvate and L-glycerol 3-phosphate to dihydroxyacetone phosphate ratios in rat heart and rat diaphragm muscles.
Biochem. J. 93, 665-673

144 Garber, A.U., Karl, I.E. & Kipnis, D.M. (1974)
Carbon sources of alanine and glutamine released by skeletal muscle.
J. Clin. Invest. 52, 31a

145 Chochinov, R.H., Perlman, K. & Moorhouse, J.A. (1978)
Circulating alanine production and disposal in healthy subjects.
Diabetes 27, 287-295

146 Felig, P. (1975)
Amino acid metabolism in man.
Annu. Rev. Biochem. 44, 933-955

Lebenslauf

Am 29. Juli 1953 wurde ich in Augsburg geboren. Meine Eltern sind Eugen Werner Edmund Edelmann und Friederike Edelmann, geb. Netzer.

1959 - 1964	Grundschule in Augsburg
1964 - 1973	Jakob-Fugger-Gymnasium in Augsburg
8. Juni 1973	Erhalt des Reifezeugnisses
1973 - 1974	Ableistung des Grundwehrdienstes bei der Bundeswehr
4. Nov. 1974	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität zu München
Aug. 1976	Ärztliche Vorprüfung
Aug. 1977	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
März 1980	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
	Zur Famulatur war ich bei einem Arzt für Allgemeinmedizin und einem Arzt für Kinderheilkunde, sowie in einer Med. Klinik in Salem, USA
1977 - 1980	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von PD. Dr. W. Kemmler und Oberarzt Dr. K.-D. Gerbitz am Institut für Diabetesforschung in München Direktion: Prof. Dr. H. Mehnert und Prof. Dr. O.H. Wieland